

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> : C12N 15/55, 1/21, A61K 37/54, C12N 11/00, 9/20	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/13816 (43) Date de publication internationale: 23 juin 1994 (23.06.94)
--	----	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/01260

(22) Date de dépôt international: 16 décembre 1993 (16.12.93)

(30) Données relatives à la priorité:  
92/15201 16 décembre 1992 (16.12.92) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT  
DE RECHERCHE JOUVEINAL [FR/FR]; 3-9, rue de la  
Loge, F-94265 Fresnes Cédex (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BLANCHARD, Claire  
[FR/FR]; 1, rue des Lacs, F-91350 Grigny (FR). BENI-  
COURT, Claude [FR/FR]; 99, rue Hoche, F-78800 Houilles  
(FR). JUNIEN, Jean-Louis [FR/FR]; 36, avenue Eiffel, F-  
92310 Sèvres (FR).

(74) Mandataires: DEMACHY, Charles etc.; Grosset-Fournier &  
Demachy S.A.R.L., 103, rue La Fayette, F-75010 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CZ, DE,  
DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, MG,  
MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA,  
US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD,  
TG).

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.*

*Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si de telles modifications sont  
reçues.*

*Avec une requête en rectification selon la règle 91.1.f).*

(54) Title: RECOMBINANT CANINE GASTRIC LIPASE AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

(54) Titre: LIPASE GASTRIQUE DU CHIEN RECOMBINANTE ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES

(57) Abstract

Canine gastric lipase (CGS) as produced by genetic engineering and the nucleotide sequence coding for said recombinant CGL. The invention also concerns the use of said recombinant CGL in the production of pharmaceutical compositions, especially for use in the treatment of pathologies related to an insufficiency, and even to the absence of lipase secretion in an individual's organism.

(57) Abrégé

La présente invention concerne la lipase gastrique de chien telle qu'obtenue par voie du génie génétique ainsi que la séquence de nucléotides codant pour cette LGC recombinante. Elle vise également l'utilisation de cette LGC recombinante pour l'obtention de compositions pharmaceutiques destinées, notamment, au traitement de pathologies liées à l'insuffisance, voire à l'absence de sécrétion de lipases dans l'organisme d'un individu.

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

LIPASE GASTRIQUE DU CHIEN RECOMBINANTE  
ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES

\*\*\*\*\*

5

-----  
La présente invention concerne des acides nucléiques codant pour la lipase  
gastrique de chien (LGC), et autres dérivés polypeptidiques de cette dernière  
possédant une activité lipasique, ainsi que leur utilisation, notamment pour la  
production de ces polypeptides. L'invention a également pour objet les  
polypeptides codés par ces acides nucléiques, et l'utilisation de ces polypeptides  
dans des compositions pharmaceutiques.

10

La LGC est une glycoprotéine d'environ 380 acides aminés (AA) d'un  
poids moléculaire d'environ 49 kilodaltons (KD) synthétisée sous forme d'un  
précurseur contenant un peptide signal à l'extrémité aminoterminal (NH<sub>2</sub>-  
terminale) et sécrétée par les cellules médianes de la muqueuse fundique de  
l'estomac de chien (Carrière F. et al., Eur. J. Biochem. 202 (1991) 75-83).

15

Cette enzyme appartient à une famille de lipases dites "préduodénales"  
dont certains membres ont déjà été purifiés et parfois même clonés (Docherty  
A.J.P. et al., Nucl. Ac. res. 13 (1985) 1891-1903 ; Bodmer M.W. et al.,  
Biochem. Biophys. Act. 909 (1987) 237-244; Moreau H. et al., Biochem.  
Biophys. Act. 960 (1988) 286-293; Brevets européens n° 0 191 061 et n° 0 261  
016)

20

Pendant longtemps, on a tenu pour acquis que l'hydrolyse des lipides  
alimentaires s'effectuait au niveau de l'intestin grêle grâce à l'action d'enzymes  
produites par le pancréas (Bernard C., C. R. Acad. Sci. 28 (1849) 249-253).

25

Des observations laissaient cependant penser que l'hydrolyse des  
triglycérides pouvait avoir lieu dans l'estomac par le biais d'enzymes  
préduodénales (Volhard, F., Z. Klin. Med. 42 (1901) 414-429; Shonheyder, F.  
and Volquartz, K. Acta Physiol. Scand. 9 (1945) 57-67). Ces enzymes, et en  
particulier la lipase gastrique de chien, ont des propriétés enzymatiques et  
physico-chimiques qui les différencient des lipases pancréatiques de  
mammifères. Ces différences entre lipases gastriques et pancréatiques  
concernent essentiellement les points suivants : poids moléculaire, composition  
en acides aminés, résistance à la pepsine, spécificité de substrat, pH optimum  
d'action, et stabilité en milieu acide.

30

35

De plus, *in vitro*, dans certaines conditions, on peut mettre en évidence  
une synergie d'action entre les lipases gastrique et pancréatique sur l'hydrolyse  
de triglycérides à chaînes longues (Gargouri, Y. et Al., Biochem. Biophys. Act.

1006 (1989) 255-271).

On connaît plusieurs situations pathologiques (mucoviscidose, insuffisance pancréatique exocrine) où les patients sont totalement ou partiellement dépourvus de sécrétion pancréatique exocrine et donc des enzymes nécessaires à l'hydrolyse des aliments (amylases, lipases, protéases). La non-absorption des graisses au niveau intestinal, et notamment des triglycérides à longues chaînes, se traduit par une augmentation très importante de la stéatorée chez ces patients et par un ralentissement très sensible de la prise de poids chez les jeunes malades. Pour remédier à cela on administre à ces sujets des extraits pancréatiques de porc au moment des repas. L'efficacité thérapeutique de ces extraits pourrait être nettement améliorée par la co-prescription de LGC grâce à sa spécificité d'action sur les triglycérides à longues chaînes.

Dans l'article paru dans Eur. J. Biochem. 201, 75-83, 1991, de F. Carrière sont décrites la purification et la détermination de la séquence NH<sub>2</sub>-terminale de la LGC. Un procédé permettant d'extraire cette enzyme à partir d'estomacs de chien est également décrit dans cette publication. Ce procédé consiste essentiellement à faire subir à des estomacs de chiens une extraction par un milieu aqueux acide (pH 2,5), on relargue l'extrait lipasique par addition de sels hydrosolubles, puis par une filtration sur tamis moléculaire, suivie d'une séparation par chromatographies par échange d'ions, ainsi que par filtration sur gel, et l'on recueille une fraction d'élution contenant la lipase. La LGC purifiée obtenue par ces procédés a un poids moléculaire selon la technique de Laemmli de 49 000 daltons, dont 6 000 correspondent à des sucres et 43 000 à une protéine.

Des raisons évidentes de difficultés d'approvisionnement en estomacs de chiens empêchent tout développement de ce procédé tant au niveau du laboratoire qu'au niveau industriel. D'où la nécessité de trouver un procédé faisant abstraction de l'utilisation d'estomacs de chiens, qui permette de produire la LGC en grande quantité.

La présente invention a précisément pour but de permettre la production de LGC à l'échelle industrielle en supprimant tout problème d'approvisionnement en matière première, et à un prix de revient avantageux.

L'invention découle de la découverte faite par les inventeurs de la séquence nucléotidique de l'ARN messager (ARNm) codant pour la LGC, après clonage de l'ADN complémentaire (ADNc) de cet ARNm à l'aide d'une sonde correspondant à la séquence nucléotidique de la lipase gastrique recombinante de lapin décrite dans la demande de brevet français déposée le 13 novembre 1991, et publiée sous le numéro 2 683 549.

La présente invention sera plus particulièrement illustrée à l'aide des figures 1 à 12 dont les légendes sont les suivantes:

Figure 1: Séquences polypeptidiques de la région de coupure des précurseurs des lipases gastrique de lapin, homme et rat, et comparaison avec la séquence NH<sub>2</sub>-terminale de la lipase gastrique de chien (SEQ ID NO 11).

Figure 2A: Conception d'un oligonucléotide dégénéré (DGL<sub>1</sub>) codant pour la région de coupure du précurseur de la LGC à partir de la comparaison de ses homologues lapin, homme, rat.

Figure 2B: Séquence des oligonucléotides DGL<sub>1</sub> (SEQ ID NO 7) et LPC<sub>2</sub> (SEQ ID NO 8).

Figure 3: Cartographie du clone 3.12.

Figure 4: Schéma de clonage de la LGC dans le vecteur pBluescript KS(+) et sous clonage du fragment "H" du clone 3.12. dans pKSPCR: obtention du clone pKSDGL10.

Figure 5: Carte de restriction du vecteur plasmidique pRU303.

Figure 6: Séquence nucléotidique du fragment d'ADN EcoRI-NdeI du plasmide pRU303.

Figure 7: Sous clonage de l'ADNc de la lipase gastrique de chien dans le vecteur d'expression pRU303 et construction du plasmide pDGL5.303.

Figure 8: Séquence nucléotidique de l'ADNc codant pour la LGC mature (SEQ ID NO 1).

Figure 9A: Séquence polypeptidique de la LGC mature (SEQ ID NO 3).

Figure 9B: Comparaison des séquences polypeptidiques de la LGH (lipase gastrique humaine) et de la LGC, et détermination du % d'homologie.

Figure 9C: Comparaison des séquences polypeptidiques de la LLR (lipase linguale de rat) et de la LGC, et détermination du % d'homologie.

Figure 9D: Comparaison des séquences polypeptidiques de la LGL (lipase gastrique de lapin) et de la LGC, et détermination du % d'homologie.

Figure 10: Mutagénèse in vitro de l'ADNc de la LGC par la technique de "PCR" à l'aide d'amorces oligonucléotidiques DGL<sub>2</sub> (SEQ ID NO 9) et DGL<sub>3</sub> (SEQ ID NO 10) en vue de la construction du plasmide pDGL5.303.

Figure 11: Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS des protéines synthétisées, en absence ou en présence d'IPTG, dans *E. coli* W3110 Iq transformée par le plasmide pDGL5.303.

Figure 12: Immunodétection à l'aide d'anticorps spécifiques de la LGC synthétisée dans *E. coli* W3110 Iq transformée par le plasmide pDGL5.303 après transfert de type "Western" sur membrane de nylon des protéines issues de ces bactéries.

Ainsi la présente invention concerne tout acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie du fragment d'ADN représenté sur la figure 8 (SEQ ID NO 1), et plus particulièrement tout ou partie du fragment d'ADN délimité par les nucléotides situés aux positions 1 et 1137 (SEQ ID NO 2) de l'ADN représenté sur la figure 8, ce fragment d'ADN codant pour le polypeptide délimité par les acides aminés situés aux positions 1 et 379 de la séquence en acides aminés représentée sur la figure 9A (SEQ ID NO 3), ce polypeptide correspondant à la LGC mature.

Par l'expression LGC ci-dessus, et ci-après, on entend toute lipase sécrétée par la muqueuse gastrique ou par une muqueuse prégastrique chez le chien.

Les acides nucléiques susmentionnés peuvent également comprendre en amont du fragment d'ADN délimité par les nucléotides situés aux positions 1 et 1137, de la figure 8, un fragment d'ADN (plus particulièrement une séquence ATG) codant pour une méthionine (SEQ ID NO 4).

L'invention vise également les fragments d'ADN susmentionnés présentant en aval de la position 1137 un codon STOP, notamment celui constitué de la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 1138, 1139 et 1140 de la figure 8 (SEQ ID NO 6).

La LGC, comme toutes les lipases gastriques purifiées ou clonées jusqu'à présent, est synthétisée sous forme d'un précurseur constitué d'un peptide signal précédant la séquence polypeptidique de la protéine mature.

D'une manière générale, l'invention concerne tout acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend en amont d'un des fragments d'ADN susmentionnés, une séquence nucléotidique codant pour un peptide signal.

Par opposition aux acides nucléiques double brin cités ci-dessus, l'invention vise également les acides nucléiques simple brin constitués de l'une ou l'autre des deux séquences nucléotidiques complémentaires constituant les fragments d'ADN susmentionnés.

L'invention concerne également tout acide nucléique susceptible de s'hybrider avec un acide nucléique simple brin tel que décrit ci-dessus, notamment dans les conditions d'hybridation citées dans la description détaillée qui suit du clonage de l'ADNc de la LGC selon l'invention.

Tout acide nucléique codant pour un polypeptide selon l'invention et dont la séquence nucléotidique diffère en fonction de la dégénérescence du code génétique des séquences nucléotidiques susmentionnées, entre également dans le cadre de la présente invention.

L'invention a également pour objet tout acide nucléique recombinant caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique tel que décrit ci-dessus selon l'invention, inséré dans une molécule d'ADN hétérologue vis-à-vis du susdit acide nucléique.

5 A ce titre l'invention a plus particulièrement pour objet tout acide nucléique recombinant comprenant un promoteur situé en amont de l'acide nucléique selon l'invention, et sous le contrôle duquel la transcription dudit acide nucléique est susceptible d'être effectuée, ainsi qu'une séquence codant pour des signaux de terminaison de la transcription située en aval dudit acide  
10 nucléique.

L'invention concerne également tout vecteur recombinant, notamment du type plasmide, cosmide ou phage, caractérisé en ce qu'il contient un acide nucléique recombinant tel que décrit ci-dessus, inséré en l'un de ses sites non essentiels pour sa réplication.

15 Les vecteurs recombinants selon l'invention sont avantageusement caractérisés en ce qu'il contiennent en l'un de leurs sites non essentiels pour leur réplication, des éléments nécessaires pour promouvoir et contrôler l'expression d'un acide nucléique selon l'invention dans un hôte cellulaire, et plus particulièrement un promoteur reconnu par les polymérases de l'hôte cellulaire,  
20 notamment un promoteur inductible.

L'invention vise également tout hôte cellulaire, de type procaryote ou eucaryote, transformé par un vecteur recombinant tel que décrit ci-dessus, et comprenant les éléments de régulation permettant l'expression d'un gène ou d'un ADNc selon l'invention.

25 A titre d'exemples de cellules hôtes susceptibles d'être transformées par un vecteur recombinant selon l'invention, on peut citer les cellules de mammifères telles que les cellules COS ou CHO, des cellules d'insectes infectables par un virus recombinant de type baculovirus, les champignons filamenteux tels que *Aspergillus niger* ou *oryzae*, les levures telles que  
30 *Saccharomyces cerevisiae* ou *Kluyveromyces lactis*, ainsi que les bactéries telles que *E.coli* (bactérie Gram négatif) ou *B.subtilis* (bactérie Gram positif).

L'invention a également pour objet des amorces d'ADN (ou d'ARN) utilisables pour la synthèse d'acides nucléiques selon l'invention par la technique d'amplification en chaîne de l'ADN, ci-après désignée par technique PCR  
35 (Polymerase Chain Reaction). Cette technique est plus particulièrement décrite dans les brevets américains n° 4, 683, 202 et n° 4, 683, 195, ainsi que dans le brevet européen n° 200.362. Les amorces selon l'invention sont avantageusement constituées d'environ 15 à 40 nucléotides correspondant aux

extrémités 3' et 5' de l'un et l'autre des deux brins constituant les fragments d'ADN susmentionnés.

L'invention vise également des sondes nucléotidiques issues de l'un ou l'autre des deux brins constituant les fragments d'ADN susmentionnés de l'invention, ainsi que l'utilisation de ces sondes, notamment pour la détection dans un échantillon biologique de la présence éventuelle de LGC.

Avantageusement, les sondes de l'invention sont constituées d'environ 17 à 23 nucléotides. La détection de la présence de LGC dans un échantillon, est de préférence réalisée après amplification du nombre de copies des gènes ou des ARNm codant pour la LGC susceptibles d'être présents dans cet échantillon, à l'aide des amorces indiquées ci-dessus.

A ce titre, l'invention concerne également un kit pour la mise en oeuvre de la méthode de détection susmentionnée, comprenant:

- le cas échéant, des amorces telles que décrites ci-dessus, ainsi que les réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réalisation de l'amplification de la séquence d'ADN ou d'ARN codant pour la LGC,
- une sonde nucléotidique telle que décrite ci-dessus, le cas échéant marquée, notamment de manière radioactive ou enzymatique, ainsi que les réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réalisation de l'hybridation entre la sonde et la séquence d'ADN ou d'ARN susmentionnée,
- les réactifs permettant la détection de la sonde hybridée avec ladite séquence.

Avantageusement les sondes nucléotidiques de l'invention sont susceptibles de s'hybrider à la fois avec la séquence d'ADN ou d'ARN codant pour la LGC et avec celles codant pour les lipases gastriques humaine (LGH) et de lapin (LGL). De telles sondes sont utilisables pour la mise en oeuvre d'une méthode de détection *in vitro* de la présence éventuelle de LGH dans un échantillon biologique susceptible de contenir cette dernière. Une telle méthode de détection est réalisée de la manière indiquée ci-dessus, et permet le diagnostic *in vitro* de pathologies liées à la surproduction, ou à l'inverse, à l'insuffisance, voire l'absence, de production de lipase gastrique dans l'organisme.

L'invention a également pour objet les polypeptides correspondant selon le code génétique universel aux acides nucléiques selon l'invention décrits ci-dessus, ou tout fragment de ces polypeptides recombinants, ou tout polypeptide modifié par substitution et/ou addition et/ou suppression d'un ou plusieurs acides aminés de ces polypeptides recombinants, ces fragments ou polypeptides modifiés conservant les propriétés enzymatiques des polypeptides recombinants susmentionnés.



Il faut entendre par "polypeptide recombinant" toute molécule possédant une chaîne polypeptidique susceptible d'être produite par voie du génie génétique, par transcription et traduction d'une séquence d'ADN correspondante sous le contrôle d'éléments de régulation appropriés à l'intérieur d'un hôte cellulaire efficace. Par conséquent, l'expression "polypeptides recombinants" n'exclut pas la possibilité que ces polypeptides aient subi des modifications pos-traductionnelles telles que la glycosylation.

Le terme "recombinant" implique le fait que le polypeptide a été produit par voie du génie génétique, plus particulièrement en raison du fait que ce polypeptide résulte de l'expression dans un hôte cellulaire de séquences d'acides nucléiques qui ont été préalablement introduites dans un vecteur d'expression utilisé dans ledit hôte.

Toutefois, il doit être entendu que cette expression n'exclut pas la possibilité que le polypeptide soit produit par un procédé différent, par exemple par synthèse chimique classique selon les méthodes classiquement utilisées pour la synthèse des protéines, ou par clivage de molécules de plus grande taille.

L'invention vise également les polypeptides susmentionnés sous forme biologiquement pure. Il faut entendre par l'expression "biologiquement pure" d'une part un degré de pureté permettant au polypeptide recombinant d'être utilisé pour la production de compositions pharmaceutiques, et, d'autre part, l'absence de contaminants, plus particulièrement de contaminants naturels.

A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement:

- le polypeptide délimité par les acides aminés situés aux positions 1 et 379 de la séquence en acides aminés représentée sur la figure 9A (SEQ ID NO 3), et correspondant à la LGC mature telle qu'obtenue par voie du génie génétique, et dont le poids moléculaire varie d'environ 43.200 à environ 50.000 daltons, suivant que l'hôte, dans lequel elle est produite, effectue des modifications post-traductionnelles sur la chaîne polypeptidique de cette LGC,

- les polypeptides susmentionnés dont les séquences en acides aminés sont précédées d'une méthionine (SEQ ID NO 5).

Avantageusement, les polypeptides susmentionnés selon l'invention, et plus particulièrement la LGC recombinante, possèdent une activité lipolytique comprise entre environ 50 U/mg de polypeptide et environ 750 U/mg de polypeptide, et de préférence supérieure à 250 U/mg de polypeptide lorsque mesurée à l'aide d'un triglycéride à chaîne courte (tel que la tributyrine), comme substrat selon la méthode de Gargouri (plus particulièrement décrite dans la description détaillée qui suit de l'invention). Une unité U correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une  $\mu$ mole d'ions  $H^+$  (c'est-à-dire,

d'acides gras libres) par minute à 37°C.

L'activité lipolytique maximale des polypeptides recombinants, selon l'invention, sur les acides gras à chaîne longue, est avantageusement obtenue à des valeurs de pH de 3 à 5.

5 Selon un autre aspect avantageux des polypeptides recombinants de l'invention, leur activité lipolytique reste inchangée après incubation durant une heure à pH 2 et à 37°C.

10 La présente invention concerne également un procédé de préparation d'un polypeptide tel que décrit ci-dessus, ce procédé comprenant la succession d'étapes suivantes:

- la mise en culture d'un hôte cellulaire, transformé par un vecteur recombinant tel que décrit ci-dessus, dans un milieu de culture approprié, et

- la récupération du polypeptide produit par ledit hôte cellulaire, soit directement à partir du susdit milieu de culture, lorsque la séquence codant pour ledit polypeptide est précédée d'une séquence signal et que l'hôte cellulaire est capable de sécréter le polypeptide dans le milieu de culture (notamment dans le cas des cellules eucaryotes et des levures), soit après lyse de l'hôte cellulaire (notamment dans le cas de bactéries).

15

20 Le cas échéant, l'étape de récupération est suivie d'une étape de purification du polypeptide récupéré, et notamment après récupération par lyse de la bactérie par une étape de solubilisation du polypeptide, puis de sa renaturation.

25 Les agents et les techniques de solubilisation des polypeptides obtenus sous forme d'inclusion sont bien connus de l'homme de l'art. Essentiellement les agents solubilisants sont l'urée, des halogénures d'ammonium quaternaires comme le chlorure de guanidinium ou le chlorure de cetyltriméthylammonium qui sont utilisés dans des procédures expérimentales telles que celles décrites par N.K. Puri et coll. dans Biochem. J (1992) 285, 871-879.

30 Avantageusement, comme il l'a été déjà précisé plus haut, les séquences nucléotidiques codant pour les polypeptides dont la production est recherchée, et insérées dans le vecteur utilisé pour transformer les cellules hôtes, sont précédées d'une séquence signal permettant ainsi la sécrétion des polypeptides produits hors des cellules hôtes et leur récupération directement à partir du milieu de culture sans avoir à procéder à la lyse desdites cellules hôtes.

35 A titre d'exemple, la synthèse de la LGC mature dans des cellules de mammifères telles que les cellules COS ou les cellules CHO pourra être obtenue en insérant l'acide nucléique codant pour le précurseur de la LGC dans un vecteur d'expression approprié.

La présence du segment d'ADN codant pour le peptide signal permettra à la machinerie cellulaire de glycosyler dans le réticulum endoplasmique et de sécréter la LGC dans le milieu de culture sous forme biologiquement active.

Alternativement, la production de lipase gastrique de chien par des cellules d'insectes pourra être obtenue en insérant l'ADNc codant pour la LGC ou son précurseur derrière un promoteur approprié dans le génome d'un virus de type baculovirus susceptible d'infecter lesdites cellules.

Pour faire produire et sécréter la LGC par une levure telle que Saccharomyces cerevisiae ou Kluyveromyces lactis, il sera préférable de remplacer, dans le cDNA, le segment d'ADN codant pour le peptide signal de la LGC par un fragment d'ADN codant pour un peptide signal de protéine de levure. L'ADNc recombinant ainsi obtenu sera alors introduit dans un vecteur d'expression spécifique de l'hôte considéré. De tels systèmes d'expression sont maintenant relativement courants. Par exemple, on peut citer l'expression de la sérum albumine humaine (Brevet européen n° 0361 991 A2) ou de la chymosine de veau (Van den Berg J.A. et al., *Biotechnology* 8 (1990) 135-139).

Escherichia coli est une bactérie Gram négatif pourvue d'une paroi chez qui les phénomènes de sécrétion de protéines dans le milieu de culture sont extrêmement réduits. Un certain nombre de protéines s'accumulent dans le périplasme bactérien grâce à la présence de signaux similaires aux séquences signal des protéines eucaryotes. Parmi celles-ci, on peut citer les produits des gènes *phoA* et *malE* par exemple. Certaines régions de ces gènes ont été utilisées pour produire des protéines hétérologues dans l'espace périplasmique de E.coli. Cependant, la synthèse dans le cytoplasme de protéines étrangères demeure le système le mieux connu et le plus utilisé chez E. coli.

Le respect de certaines règles déduites de l'expérience lors de la réalisation des constructions de plasmides permet d'optimiser le niveau d'expression des protéines d'intérêt.

Dans un premier temps, il conviendra de placer l'ADNc codant pour la partie mature de la LGC, c'est-à-dire dépourvu du segment codant pour le peptide signal, derrière un promoteur bactérien ou phagique puissant. Pour éviter des problèmes de toxicité éventuelle de la protéine étrangère dans la bactérie, on choisira de préférence un promoteur inductible par un agent chimique (promoteurs Lac ou Trp) ou par un agent physique tel que le changement de température (promoteur  $P_L$  et répresseur *ci857*). L'ADNc devra être contigu, dans sa région 5' terminale à une séquence ATG spécifiant l'initiation de la synthèse protéique sur l'ARN messenger. Cet ATG initiateur devra être précédé, à une distance de 6 à 12 paires de bases, d'une région riche

en purines, appelée région de Shine et Dalgarno, et correspondant, sur l'ARN messager, au site de fixation des ribosomes.

La séquence du segment d'ADN situé entre la région de Shine et Dalgarno et l'ATG initiateur pourra être modifiée dans sa composition de manière à  
5 réduire les éléments de structure secondaire autour du codon d'initiation AUG sur l'ARN messager. Une fois les modifications nécessaires apportées, le vecteur sera introduit dans un hôte approprié.

L'invention concerne les anticorps dirigés contre les polypeptides de l'invention, et plus particulièrement ceux dirigés contre la LGC et susceptibles  
10 de reconnaître également la LGH et la LGL. De tels anticorps peuvent être obtenus par immunisation d'un animal avec ces polypeptides suivie de la récupération des anticorps formés.

Il va de soi que cette production n'est pas limitée aux anticorps polyclonaux.

Elle s'applique encore à tout anticorps monoclonal produit par tout  
15 hybridome susceptible d'être formé, par des méthodes classiques, à partir des cellules spléniques d'un animal, notamment de souris ou de rat, immunisés contre l'un des polypeptides purifiés de l'invention d'une part, et des cellules d'un myélome approprié d'autre part, et d'être sélectionné, par sa capacité à  
20 produire des anticorps monoclonaux reconnaissant le polypeptide initialement mis en oeuvre pour l'immunisation des animaux, ainsi que la LGH.

L'invention vise également l'utilisation de ces anticorps pour la mise en oeuvre d'une méthode de détection ou de dosage de la LGC ou de la LGH dans un échantillon biologique susceptible de la contenir.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation de ces anticorps  
25 pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* de pathologies liées à la surproduction, ou à l'inverse, à l'insuffisance, voire l'absence de production de lipase dans l'organisme.

Cette méthode de diagnostic *in vitro*, réalisée à partir d'un échantillon  
30 biologique prélevé chez un patient, comprend une étape de mise en présence de cet échantillon, suivie d'une étape de détection des éventuels complexes anticorps-LGH formés lors de l'étape précédente.

A ce titre l'invention concerne également un kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de détection ou de diagnostic *in vitro* susmentionnée,  
35 comprenant:

- des anticorps tels que décrits ci-dessus, avantageusement marqués de manière radioactive ou enzymatique, ainsi que les réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réalisation de la réaction immunologique entre ces

anticorps et la LGH,

- les réactifs permettant la détection des complexes immunologiques formés entre ces anticorps et la LGH.

L'invention concerne également l'utilisation d'un ou plusieurs polypeptides décrits ci-dessus, pour l'obtention de compositions pharmaceutiques, utilisables notamment par voie orale, destinées à faciliter l'absorption des graisses animales ou végétales ingérées par un individu sain ou atteint d'une ou plusieurs pathologies affectant ou non le taux de production de lipase gastrique. Notamment, de telles compositions sont avantageusement utilisées chez les individus subissant un traitement médical altérant le mécanisme d'absorption des graisses, ou encore chez les personnes âgées.

L'invention vise plus particulièrement l'utilisation d'un, ou plusieurs polypeptides décrits ci-dessus pour l'obtention de médicaments destinés au traitement des pathologies liées à l'insuffisance, voire l'absence, de production de lipases dans l'organisme, et plus particulièrement de pathologies telles que la mucoviscidose, et l'insuffisance pancréatique exocrine.

L'invention a également pour objet des compositions pharmaceutiques comprenant au moins un polypeptide selon l'invention, le cas échéant en combinaison avec un ou plusieurs autres polypeptides à activité lipasique, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont de préférence administrables par voie orale, et se présentent notamment sous forme de gélules, de comprimés ou de poudres à diluer.

La posologie journalière chez l'homme est avantageusement d'environ 400 mg à environ 1 200 mg, répartis de préférence au moment des repas principaux, soit à raison d'environ 130 mg à environ 400 mg par repas.

L'invention concerne également l'utilisation des polypeptides tels que décrits ci-dessus selon l'invention ou toute autre lipase gastrique de mammifères et dérivés, pour la mise en oeuvre de réactions de bioconversions enzymatiques (telles que hydrolyses, trans-estérifications enzymatiques), notamment sous forme immobilisée sur un support solide.

S'agissant de la préparation des acides nucléiques de l'invention, celle-ci peut être effectuée par voie chimique, notamment selon l'un des procédés suivants.

Un mode de préparation approprié des acides nucléiques (comportant au maximum 200 nucléotides) de l'invention par voie chimique comprend les étapes suivantes:

- la synthèse d'ADN en utilisant la méthode automatisée de  $\beta$ -cyanéthyl phosphoramidite décrite dans Bioorganic Chemistry 4; 274-325, 1986,
- le clonage des ADN ainsi obtenus dans un vecteur plasmidien approprié et la récupération des ADN par hybridation avec une sonde appropriée.

Un mode de préparation, par voie chimique, d'acides nucléiques de longueur supérieure à 200 nucléotides, comprend les étapes suivantes:

- l'assemblage d'oligonucléotides synthétisés chimiquement, pourvus à leurs extrémités de sites de restriction différents, dont les séquences sont compatibles avec l'enchaînement en acides aminés du polypeptide naturel selon le principe décrit dans Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80; 7461-7465, 1983,
- le clonage des ADN ainsi obtenus dans un vecteur plasmidien approprié et la récupération de l'acide nucléique recherché par hybridation avec une sonde appropriée.

L'invention sera plus particulièrement illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de la construction de vecteurs recombinants selon l'invention et de leur utilisation pour la production de LGC.

Une préparation d'ARN a été réalisée à partir de muqueuse isolée de la région fundique d'estomac de chien. Les ARN messagers isolés par chromatographie d'affinité, sur colonne d'oligo-dT cellulose ont été convertis en ADN complémentaire (ADNc) grâce à l'utilisation d'enzymes particulières: la reverse transcriptase du Virus du Sarcome de Rous et la DNA polymérase I de *E.coli* (fragment de Klenow). Cet ADNc a été introduit dans le vecteur pUC18 après certaines modifications et les molécules recombinantes ont été utilisées pour transformer la bactérie *E.coli* MM294. Les clones transformants ont été criblés par hybridation in situ à l'aide d'une sonde contenant l'ADNc de la lipase gastrique de lapin marquée radioactivement. Après autoradiographie, les colonies bactériennes correspondant à un signal positif lors de l'expérience d'hybridation, ont été isolées et l'ADN plasmidique présent dans leur cytoplasme amplifié et purifié.

Après criblage des clones obtenus, le clone 3.12 a été sélectionné et séquencé. Ce clone contient un insert PstI-PstI de 1201 paires de bases, insert lui-même divisé en deux parties inégales H et L par un site de restriction PstI.

Aucun clone contenant l'ADNc complet n'a pu être mis en évidence à ce stade.

Afin d'isoler le clone contenant l'ADNc codant pour la lipase de chien mature, une technique complémentaire a été utilisée.

Une fraction d'ARNm issue de la préparation de départ est convertie en ADNc simple brin grâce à l'enzyme reverse transcriptase et à une amorce

oligonucléotidique LPC<sub>2</sub> (figure 2B) obtenue à partir de la séquence 3' terminale de l'ADNc contenu dans le clone 3.12 précédemment isolé et séquencé.

L'ADNc codant pour la partie mature de la LGC est ensuite obtenu et amplifié par la méthode de PCR, en présence de Taq Polymérase et de deux amorces oligonucléotidiques, LPC<sub>2</sub> telle que susmentionnée, et DGL<sub>1</sub> conçue à partir de la comparaison des séquences nucléotidiques 5' terminales des lipases gastriques humaine et de lapin, de la lipase linguale de rat et de la séquence protéique NH<sub>2</sub>-terminale connue de la LGC.

L'ADNc double brin ainsi obtenu a été introduit dans le vecteur pBluescript KS(+) après certaines modifications et les molécules recombinantes ont été utilisées pour transformer la bactérie *E. coli* MM294. Les clones transformants ont été criblés par PCR à l'aide de sondes oligonucléotidiques correspondant aux parties de la séquence du vecteur pBluescript KS(+) situées de part et d'autre de l'insert. Le clone pKSPCR contenant un insert de 700 paires de bases a été sélectionné et séquencé.

Parallèlement, après digestion par l'enzyme de restriction PstI, le fragment "H" de l'insert d'ADNc du clone 3.12 tel qu'obtenu précédemment est inséré dans le plasmide pKSPCR linéarisé par PstI; on obtient un clone pKSPCR 10 qui contient l'ADNc codant pour la lipase gastrique de chien mature.

L'analyse de la séquence nucléotidique de cet ADNc a permis de mettre en évidence une phase ouverte de lecture de 1137 nucléotides (NT) correspondant à une protéine de 379 AA et d'un poids moléculaire de 43222 daltons.

La comparaison avec les séquences nucléotidiques des autres lipases préduodénales (Docherty, A.P.J. et al. (1985) op.cit.; Bodmer, M.W. et al. (1987) op.cit.; Moreau, H. et al (1988) op.cit.) fait apparaître une homologie de 84,7 % avec la LGH, de 75,7 % avec la LLR et de 81 % avec la LGL dans les régions codantes.

De façon alternative, un second procédé peut être utilisé pour l'obtention d'un clone contenant l'ADNc codant pour la LGC mature.

Dans le cas où les ARNm extraits de la muqueuse d'estomac de chien, isolés par chromatographie d'affinité sur colonne oligo-dT, et convertis en ADNc grâce à l'utilisation d'enzymes spécifiques (reverse transcriptase du virus du Sarcome de Rous et DNA polymérase I de *E.coli*) correspondent à l'ARNm entier de la LGC mature ou de son précurseur, l'ADNc ainsi obtenu pourra être introduit après certaines modifications dans le vecteur pUC18 et les molécules recombinantes utilisées pour transformer une cellule hôte, de préférence bactérie ou levure; les clones transformants seront criblés par hybridation in situ à l'aide

de sondes issues de la lipase gastrique de lapin.

Après autoradiographie, les colonies de cellules hôtes correspondant à un signal positif lors de l'hybridation seront isolées et l'ADN plasmidique présent dans le cytoplasme de ces cellules, amplifié et purifié. Avantageusement, les techniques générales de clonage utilisées dans ce second procédé seront les mêmes que celles mises en oeuvre dans le procédé précédemment décrit.

#### **Techniques générales de clonage:**

Les méthodes classiques de biologie moléculaire, telles que la purification des ARN messagers, l'extraction et la purification d'ADN plasmidique, la digestion par des enzymes de restriction, l'électrophorèse sur gel d'agarose ou de polyacrylamide, l'électroélution de gel d'agarose de fragments d'ADN, la transformation dans *E.coli*, sont décrites dans la littérature (Maniatis, T. et al., "Molecular cloning: a laboratory manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 ; Ausubel, F.M. et al. (eds.), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, New-York, 1987).

Le "random priming" s'effectue selon la méthode décrite par Feinberg et Vogelstein (Anal. Biochem. (1983) 132: 6; Anal. Biochem. (1984) 137: 266).

Les enzymes sont obtenues auprès des sociétés Boehringer ou New England Biolabs et utilisées dans les conditions préconisées par les fournisseurs.

Les fragments d'ADN destinés à être assemblés sont séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %, purifiés par électroélution et précipités par l'éthanol. La ligature des fragments d'ADN s'effectue en présence de T<sub>4</sub>DNA ligase à 4°C ou à 16°C dans un tampon approprié selon que les morceaux à assembler possèdent des extrémités franches ou cohésives.

Le séquençage de l'ADN s'effectue selon la méthode des didésoxynucléotides (Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74 (1977) (5463-5467) en utilisant un kit "T7 Sequencing" (Pharmacia).

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN spécifiques s'effectue selon la méthode de "Polymerase-catalysed Chain Reaction" ou PCR (Saiki, R.K. et al., Science 220 (1985) 1350-1354) à l'aide d'un appareil PREM III LEP Scientific.

Les oligonucléotides utilisés comme amorces dans les réactions de PCR ou de séquençage sont synthétisés à l'aide d'un synthétiseur d'ADN modèle 391 PCR-MATE (Applied Biosystems) et purifiés par chromatographie haute pression en phase liquide avant leur utilisation.

Les molécules d'ADN recombinantes sont utilisées pour transformer des cellules compétentes des souches suivantes de *E.coli* :



- MM294 [F<sup>-</sup>, endA1, hsdR17 (r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub>+), supE44, thi-1, relA1],

ou

- W3110 Iq[F<sup>'</sup>TraD36, LacIq, <sub>-</sub>(lac Z)M15, pro+].

L'ADN plasmidique est extrait des transformants bactériens résistants à l'ampicilline selon un protocole dérivé de la méthode de lyse alcaline décrite par Birnboim et Doly (Birnboim, H.C. and Doly, J., Nucl. Ac. Res. 7 (1979) 1512-1523).

L'immunodétection de la lipase gastrique de chien synthétisée dans la bactérie *E. coli* W3110 Iq, après addition d'IsoPropylThioGalactopyranoside (IPTG) au milieu de culture, s'effectue par une méthode d'immunoempreinte sur membrane de nylon en utilisant un anticorps de cobaye anti-LGC et le kit de révélation à la peroxydase ImmunoPure ABC (Pierce).

La préparation de la LGC est avantageusement illustrée, quoique de façon non limitative, par l'exemple suivant de l'expression de la LGC dans la bactérie *E. coli* W3110 Iq.

Le procédé de préparation de la lipase comprend plusieurs étapes qui sont détaillées dans ce qui suit:

**Etape n° 1: Clonage d'un ADNc codant pour la lipase gastrique de chien.**

**1.1. Isolement et purification des ARN messagers de muqueuse fundique d'estomac de chien.**

Après broyage des tissus dans un tampon contenant du chlorure de lithium et de l'urée (Auffray, C. and Rougeon, F., Eur. J. Biochem. 107 (1980) 303-314), l'ARN total est séparé de l'ADN par précipitation sélective au chlorure de lithium. Les protéines contaminant l'ARN sont alors éliminées par extraction phénolique. Les ARN messagers, polyadénylés à leur extrémité 3'OH, sont séparés des ARN ribosomaux par chromatographie sur colonne d'oligo-dT cellulose (Maniatis, T. et al., déjà cité). On obtient ainsi environ 75 microgrammes d'ARN messenger par gramme de tissu.

**1.2. Mise en évidence de l'ARN messenger codant pour la LGC dans la préparation d'ARN messenger extraite de muqueuse fundique d'estomac de chien.**

La lipase gastrique de chien a été purifiée à l'homogénéité et sa séquence polypeptidique NH<sub>2</sub>-terminale déterminée (Carrière F. et al, déjà cité).

Une sonde constituée de l'ADN codant pour le précurseur de la lipase de lapin est utilisée pour vérifier la présence d'un ARNm codant pour la LGC dans la préparation obtenue.

Une expérience d'hybridation de type "Northern" est réalisée. Un échantillon de 20  $\mu$ g d'ARN messager d'estomac de chien est dénaturé à 60° C, en présence de glyoxal et de DMSO, puis les ARNm sont séparés selon la taille, par électrophorèse, dans un gel d'agarose 1% en tampon phosphate 10mM pH=7 (Thomas, P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 (1980) 5201-5205).

Après électrophorèse, l'ARN messager est transféré sur une membrane de nylon (Biodyne PALL) selon le protocole préconisé par le fournisseur.

Le fragment d'ADNc correspondant à la lipase de lapin est marqué par "random priming". Les membranes précédemment obtenues sont hybridées individuellement pendant 36 heures à 37°C dans un tampon 5 X SSC - 5 X Denhardt's - 50 mM phosphate de sodium pH=6,5 - 0,1% SDS - 50% formamide, contenant 10 ng/ml de la sonde radioactive (Ausubel, F. et al. (eds), déjà cité). Les températures utilisées tiennent compte des éventuelles homologies de séquences entre la LGL et la LGC. Un ARNm d'environ 1700 nucléotides s'hybride avec la sonde radioactive.

### 1.3. Synthèse d'ADN complémentaire à partir d'ARNm d'estomac de chien et insertion dans le vecteur pUC18.

La synthèse d'ADNc double brin est réalisée à partir de 4 $\mu$ g d'ARN polyA+, en présence de 50 unités d'AMV reverse transcriptase, de 100 ng d'une amorce oligo-dT et de la DNA polymérase I de *E.coli*.

Une fraction de cet ADN est insérée dans le vecteur pUC18 par le biais de queues oligo-dC et oligo-dG, ajoutées respectivement sur l'ADNc et sur le vecteur préalablement linéarisé par l'enzyme PstI (Gubler, U. and Hoffman, B.J., Gene 25 (1983) 263-269).

Les molécules hybrides sont utilisées pour transformer des bactéries compétentes *E.coli* MM294. La sélection des transformants s'effectue en étalant le produit de la transformation sur un milieu nutritif solide (LB-Agar) contenant de l'ampicilline à 50 mg/litre.

### 1.4. Isolement de l'ADNc codant pour la LGC.

Les colonies bactériennes issues de la transformation, sont transférées sur des membranes de nylon (Biodyne PALL) et lysées selon un procédé recommandé par le fournisseur. Cette opération a pour effet de dénaturer et de fixer sur la membrane l'ADN bactérien et plasmidique contenu dans les colonies.

Après plusieurs lavages dans un tampon 3X SSC - 0,1 % SDS, à température ambiante puis à 65°C, les filtres sont préhybridés pendant deux heures à 65°C dans un tampon 6 X SSC - 10 X Denhardt's - 0,1% SDS, puis hybridés à 50°C dans le même tampon contenant la sonde lapin marquée au

$^{32}\text{P}$  par "random priming", à raison de 0,5  $\mu\text{Ci}$  par ml de tampon.

Les filtres sont lavés dans un tampon 2 X SSC - 0,1% SDS à température ambiante puis à 50°C dans le même tampon, avant d'être placés en autoradiographie pendant 24 à 48 heures.

Un criblage des colonies est effectué sur deux séries de filtres avec la sonde lapin. On obtient ainsi le clone 3.12 (figure 3).

### 1.5. Synthèse d'ADNc grâce à l'oligonucléotide spécifique LPC<sub>2</sub> et insertion dans le vecteur pBluescript KS(+).

#### 1.5.a. Synthèse d'ADNc grâce à l'oligonucléotide spécifique LPC<sub>2</sub>.

Une synthèse d'ADNc simple brin est réalisée à partir de 5  $\mu\text{g}$  d'ARN polyA+, en présence de 50 unités d'AMV reverse transcriptase et de 100 ng d'un oligonucléotide synthétique LPC<sub>2</sub> spécifique de la LGC, et correspondant à la séquence en 3' de l'ADNc contenu dans le clone 3.12 précédemment décrit.

Après extraction de la solution au phénol chloroforme et précipitation dans l'alcool, le culot obtenu est dissous dans 20 microlitres d'eau distillée; l'ADNc simple brin en solution est alors amplifié et transformé en ADN double brin par la technique de la "PCR" à l'aide des amorces DGL<sub>1</sub> et LPC<sub>2</sub> présentées à la figure 2B, afin d'être cloné dans un vecteur approprié. L'amorce DGL<sub>1</sub> utilisée ci-dessus, est constituée d'un mélange de 12 séquences, chacune de ces séquences correspondant à l'une des combinaisons possibles de représentation de DGL<sub>1</sub> en tenant compte du fait que deux nucléotides T peuvent être remplacés par un nucléotide C, et qu'un nucléotide G peut être remplacé par un nucléotide T ou un nucléotide A, aux positions indiquées en dessous de l'amorce DGL<sub>1</sub> représentée sur les figures 2A et 2B.

#### 1.5.b. Insertion dans le vecteur pBluescript KS(+).

Après digestion par l'enzyme PstI, le fragment de 700 pb d'ADNc est inséré dans le vecteur pBluescript KS(+) digéré par les enzymes de restriction SmaI et PstI.

Les molécules recombinantes issues de la ligation sont utilisées pour transformer des bactéries compétentes *E.coli* MM294. La sélection des transformants s'effectue en étalant le produit de la transformation sur un milieu nutritif solide (LB-Agar) contenant de l'ampicilline à 50 mg/litre.

On obtient ainsi le clone pKSPCR.

#### 1.5.c. Ligation du fragment "H" du clone 3.12. dans le plasmide pKSPCR.

Le clone 3.12 est digéré par l'enzyme de restriction PstI; le fragment "H" PstI-PstI de 850 paires de bases du clone 3.12 correspondant à la région 3' de

l'ADNc de la LGC, est inséré dans le plasmide pKSPCR préalablement linéarisé par l'enzyme PstI.

L'ensemble de ces étapes est présenté dans la figure 4.

#### **1.6. Isolement de l'ADNc du clone pKS DGL10.**

Un clone, pKS DGL10, a été sélectionné après le criblage par "PCR" (C. Blanchard et C. Benicourt, Boehringer, "Le brin complémentaire", septembre 1992, n°8, p6.). La coupure par des enzymes de restriction du plasmide pKSDGL10, montre qu'il contient un insert de 1,5 Kb. Ce plasmide est préparé à partir d'un litre de culture bactérienne en vue de son analyse détaillée et de son séquençage.

Le séquençage du clone est réalisé sur l'ADN double brin par la méthode de Sanger (Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74 (1977) 5463-5467).

La séquence complète de l'ADNc comporte 1528 nucléotides et est présentée dans la figure 8. Une phase ouverte de lecture allant du nucléotide 1 au nucléotide 1137 code pour une protéine de 379 AA. La séquence de cette protéine est rapportée dans la figure 9A. Cette protéine possède 81 % d'homologie avec la lipase gastrique de lapin (Brevet Français n° 91 13948).

#### **Etape n° 2: Construction de plasmides pour exprimer la LGC dans Escherichia Coli.**

##### **2.1. Choix du vecteur d'expression.**

Le vecteur retenu pour exprimer la LGC dans E.coli est un plasmide dans lequel un fragment d'ADN synthétique de 160 pb contenant un promoteur de type Tac et un terminateur de transcription, a été inséré entre les sites EcoRI et NdeI de pBR322 (Bolivar, F. et al., Gene 2 (1977) 95-113). La carte de restriction du vecteur pRU303 est présentée dans la figure 5 et la séquence nucléotidique du fragment d'AD EcoRI-NdeI dans la figure 6.

##### **2.2. Construction du plasmide pDGL5.303**

Malgré les études exhaustives qui ont été faites, peu de corrélations ont pu être établies entre le niveau d'expression d'une protéine hétérologue dans une bactérie et la séquence nucléotidique de la région 5'-terminale de l'ARN messenger de cette même protéine. Cependant, nombre d'observations ont permis de déduire certaines règles empiriques pouvant conduire à un niveau d'expression plus élevé dans les bactéries recombinantes.

Parmi ces "règles", on peut citer:

- la distance entre la région de Shine et Dalgarno et l'AUG initiateur comprise entre 6 et 12 nucléotides,
- une séquence de Shine et Dalgarno riche en purines (AGGA),

- une structure secondaire minimale entre Shine et Dalgarno et l'AUG initiateur,

- l'absence de structure secondaire (double brin) dans les régions de l'ARN messager contenant la séquence Shine et Dalgarno et l'AUG initiateur.

5 On peut tenir compte de telles contraintes dans les programmes d'analyse permettant de définir les séquences nucléotidiques de régions 5' non codantes des ARNm susceptibles de conduire aux meilleurs niveaux d'expression de protéines hétérologues particulières, telles que la LGC dans E.coli.

10 Grâce à des amorces synthétiques spécifiques DGL<sub>2</sub> et DGL<sub>3</sub> présentées dans la figure 10 et par la technique d'amplification génique "PCR", l'ADNc codant pour la partie mature de la LGC est positionné derrière un codon d'initiation de la traduction ATG et placé entre des séquences nucléotidiques telles qu'on puisse l'insérer dans le vecteur d'expression pRU303 entre les sites de restriction BglII et SalI. Du fait de la présence, dans la construction  
15 pDGL5.303, d'un codon ATG immédiatement en amont des séquences codant pour la LGC, les protéines recombinantes obtenues posséderont, totalement ou partiellement, une méthionine à leur extrémité NH<sub>2</sub>-terminale.

Le plasmide recombinant pDGL5.303 dont le schéma de construction est reporté dans la figure 7 a été obtenu dans la souche E.coli MM294 puis  
20 transféré dans la souche E.coli W3110 Iq, fréquemment utilisée pour l'expression de protéines hétérologues. Cette souche contient le gène du répresseur LacI<sup>q</sup> situé sur un épisome non transférable F': le répresseur synthétisé en quantité importante dans la bactérie réprime l'expression de tous les gènes placés sous contrôle d'un promoteur de type lactose.

### 25 Etape n°3: Expression de la LGC dans E. coli.

Le plasmide pDGL5.303 a été introduit dans l'hôte E.coli W3110 Iq. Les bactéries transformées par le plasmide sont cultivées dans du milieu en présence de M9 glucose (Maniatis, T. et al., déjà cité). Pendant la phase exponentielle de croissance, l'expression de la lipase gastrique de chien est induite par addition  
30 d'IPTG à la concentration finale de 2mM.

Après 4 heures à 37° C, les bactéries sont récoltées, centrifugées et lavées avec du tampon PBS. Les bactéries sont ensuite lysées dans un tampon contenant du SDS et du β-mercaptoéthanol pendant 10 minutes à 100° C.

35 L'analyse des protéines sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes permet la mise en évidence d'une bande protéique pouvant correspondre à la lipase. La protéine est exprimée à un taux tel qu'elle peut être détectée par cette technique comme ceci est montré dans la figure 11.

Afin de s'assurer que cette protéine, induite par addition d'IPTG au milieu de culture, correspond bien à la LGC, les protéines provenant de cultures de bactéries transformées par le plasmide pLGC5.303 induites et non-induites par l'agent chimique sont transférées sur une membrane de nylon après qu'elles  
5 aient été séparées selon leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS.

Le complexe entre la LGC et l'anticorps anti-LGC peut-être mis en évidence grâce à une réaction colorimétrique faisant intervenir un deuxième anticorps couplé à une enzyme, la peroxydase de raifort. Les résultats sont  
10 présentés dans la figure 12.

Plutôt que d'être produite sous forme de corps d'inclusion dans le cytoplasme de la bactérie *Escherichia coli*, la lipase gastrique de chien peut être avantageusement sécrétée dans le périplasme bactérien en insérant l'ADNc codant pour l'enzyme mature dans un vecteur approprié, sous contrôle d'un  
15 promoteur inductible par un agent physique ou chimique, et en aval d'un segment d'ADN codant pour un peptide signal tel que celui présent à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale de la protéine ompA (Movva N.R. et al. J. Biol. Chem. 256: 27-29, 1980).

La lipase gastrique de chien peut également être synthétisée dans  
20 *Escherichia coli* sous la forme d'une protéine de fusion soluble avec la protéine A de *Staphylococcus aureus* permettant sa purification ultérieure. A cette fin, l'ADNc codant pour la lipase mature est inséré dans le vecteur pRIT2T (Nilsson B. et al. EMBO J. 4: 1075-1080, 1985) qui a préalablement été modifié afin d'y introduire un fragment d'ADN codant pour le site de reconnaissance  
25 Ile-Glu-Gly-Arg du facteur Xa de la coagulation. La protéine de fusion ainsi produite peut être séparée des autres protéines du cytoplasme de la bactérie par chromatographie d'affinité sur une colonne d'IgG-Sépharose (Pharmacia). Après élution de la colonne, la protéine de fusion est clivée par le facteur Xa. Le produit de l'hydrolyse est à nouveau soumis à une chromatographie sur une  
30 colonne d'IgG-Sépharose qui retient la protéine A permettant ainsi d'obtenir la lipase gastrique de chien à l'état pur et sous forme soluble.

Il est également possible d'obtenir la lipase gastrique de chien à partir de cellules de mammifères en culture. Pour cela, il convient d'insérer l'ADNc codant pour le précurseur de cette lipase dans un vecteur approprié tel que le  
35 plasmide pCDNAI-Neo (Invitrogen corporation) sous contrôle du promoteur du Cytomégalo virus (CMV), ou encore l'ADNc codant pour la lipase mature dans le même type de vecteur, mais en aval d'un segment d'ADN codant pour le peptide signal de la lipase gastrique de lapin (Bénicourt C. et al; Demande de

brevet Français n° 2 633 549 susmentionnée). L'introduction de tels plasmides recombinants dans les cellules COS-7 de rein de singe exprimant l'antigène T du virus SV40 de façon constitutive permet de produire transitoirement la lipase gastrique de chien dans le milieu de culture en quantité notable. Des lignées cellulaires exprimant la lipase gastrique de chien de façon constitutive peuvent être obtenues en introduisant l'un des deux plasmides recombinants dans des cellules d'ovaire de hamster (CHO) et en exerçant une pression de sélection avec l'antibiotique G418 ou généticine du fait de la présence d'un gène de résistance aux aminoglycosides tels que la néomycine sur lesdits plasmides.

La détection de l'activité de la LGC recombinante, notamment celle issue d'un lysat bactérien provenant d'une culture de W3110 I9 (pDGL5.303), est réalisée par la méthode de Gargouri et al (Gastroenterology 91 (1986) 265-275) en utilisant la tributyrine comme substrat.

On rappellera ci-après, les conditions expérimentales dans lesquelles les activités spécifiques des polypeptides recombinants, sont déterminés.

L'activité spécifique est définie comme étant le rapport de l'activité enzymatique et de la quantité de protéines de l'échantillon exprimée en milligrammes. L'activité lipasique est déterminée par la méthode titrimétrique de Y. Gargouri (préalablement cité), dans laquelle le substrat utilisé est la tributyrine. Le dosage consiste à neutraliser l'acide butyrique libéré sous l'action de la lipase par une solution de soude 0,1 N à pH constant de 6 et à une température de 37°C. Dans ces conditions d'essai, l'activité enzymatique correspond au nombre de micromoles d'acide libérées en une minute par l'action du produit soumis à l'essai.

Pratiquement, l'essai consiste à introduire, dans une cellule de titration thermostatée à 37°C:

- Tributyrine: 0,50 ml,

- Solution isotonique d'albumine bovine de sérum et de taurodésoxycholate de sodium 14,50 ml (Composition: albumine bovine de sérum 100 mg, taurodésoxycholate de sodium 2 mM, soluté isotonique à 0,9% de NaCl q.s.p. un litre).

Sous agitation électromagnétique et à l'aide d'un titrimètre automatique, le mélange est amené à pH 6 par addition de soude 0,1 N. Après stabilisation du pH à cette valeur, on ajoute, exactement mesurés, de 0,5 à 1 ml d'une solution aqueuse du composé enzymatique à doser. Dans ces conditions expérimentales, la quantité de solution de soude 0,1 N nécessaire pour maintenir le pH à 6 durant 2 minutes permet le calcul de l'activité lipasique telle que définie précédemment.

L'activité lipolytique peut également être mesurée par la méthode utilisant un substrat chromogénique tel que le 1,2-0-dilauryl-rac-glycéro-3-glutarate de résorufine (Boehringer), et décrite dans la notice du fabricant.



## REVENDICATIONS

1. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie du fragment d'ADN représenté sur la figure 8 (SEQ ID NO 1), et plus particulièrement tout ou partie du fragment d'ADN délimité par les nucléotides situés aux positions 1 et 1137 (SEQ ID NO 2) de l'ADN représenté sur la figure 8, ce fragment d'ADN codant pour le polypeptide délimité par les acides aminés situés aux positions 1 et 379 (SEQ ID NO 3) de la séquence en acides aminés représentée sur la figure 9A, ce polypeptide correspondant à la lipase gastrique de chien.
2. Acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend en amont du fragment d'ADN délimité par les nucléotides situés aux positions 1 et 1137, un fragment d'ADN codant pour une méthionine (SEQ ID NO 4).
3. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend en amont d'un des fragments d'ADN selon la revendication 1, une séquence nucléotidique codant pour un peptide signal.
4. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend l'une ou l'autre des deux séquences nucléotidiques complémentaires constituant les fragments d'ADN selon l'une des revendications 1 à 3.
5. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il est susceptible de s'hybrider avec un acide nucléique selon la revendication 4.
6. Acide nucléique codant pour un polypeptide tel que défini dans l'une des revendications 1 à 3, et dont la séquence nucléotidique diffère, en fonction de la dégénérescence du code génétique, des séquences nucléotidiques définies dans l'une des revendications 1 à 5.
7. Acide nucléique recombinant caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 6, inséré dans une séquence nucléotidique hétérologue vis à vis du susdit acide nucléique.
8. Acide nucléique recombinant selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend un promoteur situé en amont de l'acide nucléique selon l'une des

revendications 1 à 6, et sous le contrôle duquel la transcription dudit acide nucléique est susceptible d'être effectuée, ainsi qu'une séquence codant pour des signaux de terminaison de la transcription située en aval dudit acide nucléique.

5           9. Vecteur recombinant, notamment du type plasmide, cosmide ou phage, caractérisé en ce qu'il contient un acide nucléique recombinant selon la revendication 7 ou la revendication 8, en l'un de ses sites non essentiels pour sa réplique.

10           10. Vecteur recombinant selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il contient en l'un de ses sites non essentiels pour sa réplique, des éléments nécessaires pour promouvoir et contrôler l'expression d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 6, dans un hôte cellulaire, et plus particulièrement un promoteur reconnu par les polymérases de l'hôte cellulaire,  
15           notamment un promoteur inductible.

          11. Hôte cellulaire, de type procaryote ou eucaryote, transformé par un vecteur recombinant selon la revendication 9 ou la revendication 10, et comprenant les éléments de régulation permettant l'expression d'un acide  
20           nucléique selon l'une des revendications 1 à 8.

          12. Polypeptide caractérisé en ce qu'il est codé par un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 6.

25           13. Polypeptide selon la revendication 12, correspondant selon le code génétique universel à l'acide nucléique selon la revendication 1, et délimité par les acides aminés situés aux positions 1 et 379 de la séquence en acides aminés représentée sur la figure 9A (SEQ ID NO 3).

30           14. Polypeptide selon la revendication 12, correspondant selon le code génétique universel à l'acide nucléique selon la revendication 2, ce polypeptide étant constitué de la séquence en acides aminés délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 et 379 de la figure 9A, et précédée d'une méthionine à l'extrémité NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO 5).

35           15. Polypeptide caractérisé en ce qu'il comprend un fragment des polypeptides recombinants selon l'une des revendications 12 à 14, ou tout polypeptide modifié par substitution et/ou addition et/ou suppression d'un ou

plusieurs acides aminés de ces polypeptides recombinants, ces fragments ou polypeptides modifiés conservant les propriétés enzymatiques des polypeptides recombinants susmentionnés.

5           **16.** Procédé de préparation d'un polypeptide selon l'une des revendications 12 à 15, comprenant la succession d'étapes suivantes:

- la mise en culture d'un hôte cellulaire selon la revendication 11, dans un milieu de culture approprié, et
- la récupération du polypeptide produit par ledit hôte cellulaire, soit  
10 directement à partir du susdit milieu de culture, soit après lyse de l'hôte cellulaire.

15           **17.** Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un type de polypeptide selon l'une des revendications 12 à 15, le cas échéant en combinaison avec un ou plusieurs autres polypeptides à activité lipasique, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

20           **18.** Utilisation d'un ou plusieurs des polypeptides selon l'une des revendications 12 à 15, pour l'obtention de médicaments destinés à faciliter l'absorption des graisses animales ou végétales ingérées par un individu sain ou atteint d'une ou plusieurs pathologies affectant ou non le taux de production de lipase gastrique.

25           **19.** Utilisation d'un ou plusieurs des polypeptides selon l'une des revendications 12 à 15, pour l'obtention de médicaments destinés au traitement des pathologies liées à l'insuffisance, voire l'absence, de production de lipases dans l'organisme, et plus particulièrement de pathologies telles que la mucoviscidose, et l'insuffisance pancréatique exocrine.

30           **20.** Utilisation d'un ou plusieurs des polypeptides selon l'une des revendications 12 à 15, ou de toute autre lipase gastrique de mammifères et dérivés, pour la mise en oeuvre de réactions de bioconversions enzymatiques (telles que hydrolyses, trans-estérifications enzymatiques), notamment sous forme immobilisée sur un support solide.

1/16

LIPASE	1						
gastrique	Thr	His	Gly	Leu	Phe	Gly	Lys
humaine							
gastrique	Thr	His	Gly	Leu	Phe	Gly	Lys
de lapin							
linguale	Ala	His	Gly	Leu	Phe	Gly	Lys
de rat							
gastrique				Leu	Phe	Gly	Lys
de chien							

Figure 1

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

2/16

## LIPASE

gastrique	94							
humaine	↓	CA	CAT	GGT	TTG	TTT	GGA	AAA
gastrique	103							
de lapin	↓	CA	CAT	GGT	CTT	TTT	GGA	AAA
linguale	94							
de rat	↓	CA	CAT	GGC	CTA	TTT	GGA	AAA

5' GG GCA CAT GGT TTG TTT GGA AAA 3' (DGL<sub>1</sub>)  
 ½ site SmaI C C T  
 A

CCC GGG

site SmaI

GGG CCC

Figure 2A

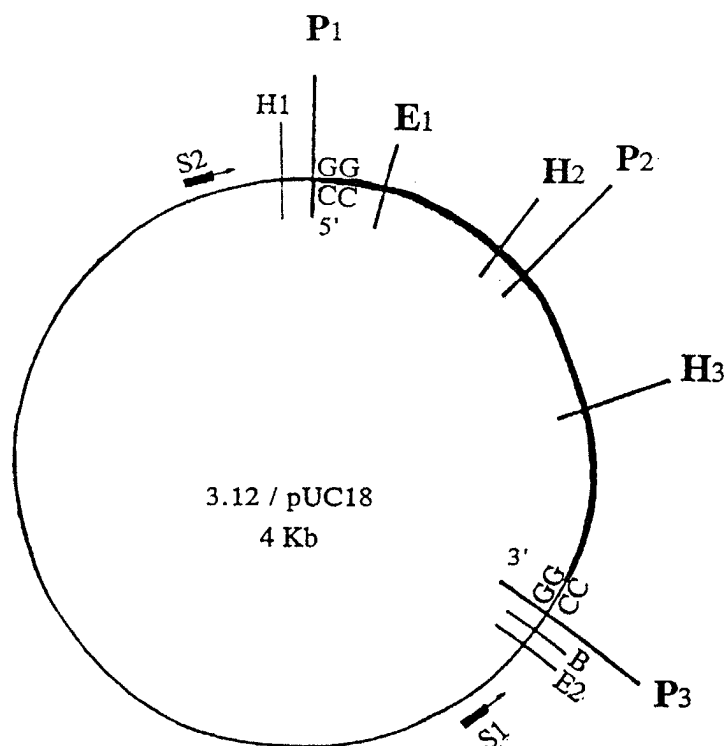
3/16

DGL1 (23-mère) 5' GG GCA CAT GGT TTG TTT GGA AAA 3'  
C C T  
A

LPC2 (17-mère) 5' ACT ACT ATC ACG TAG TA 3'

Figure 2B

4/16



P = Pst I

H = Hind III

E = EcoR I

B = BamH I

S1 = Site du primer universel

S2 = Site du primer reverse universel

Figure 3

5/16

CLONAGE DE LA LIPASE GASTRIQUE DE CHIEN

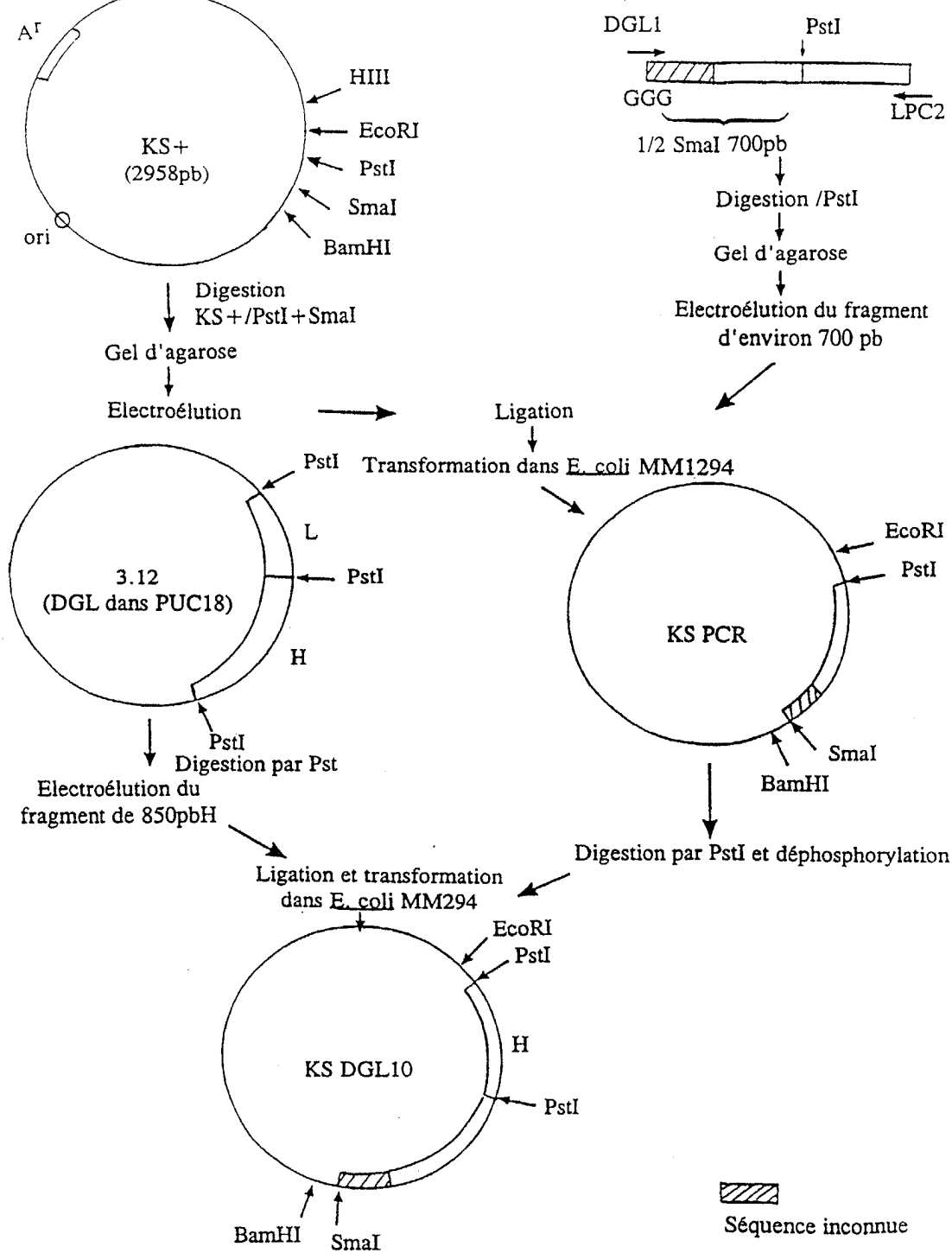


Figure 4



6/16

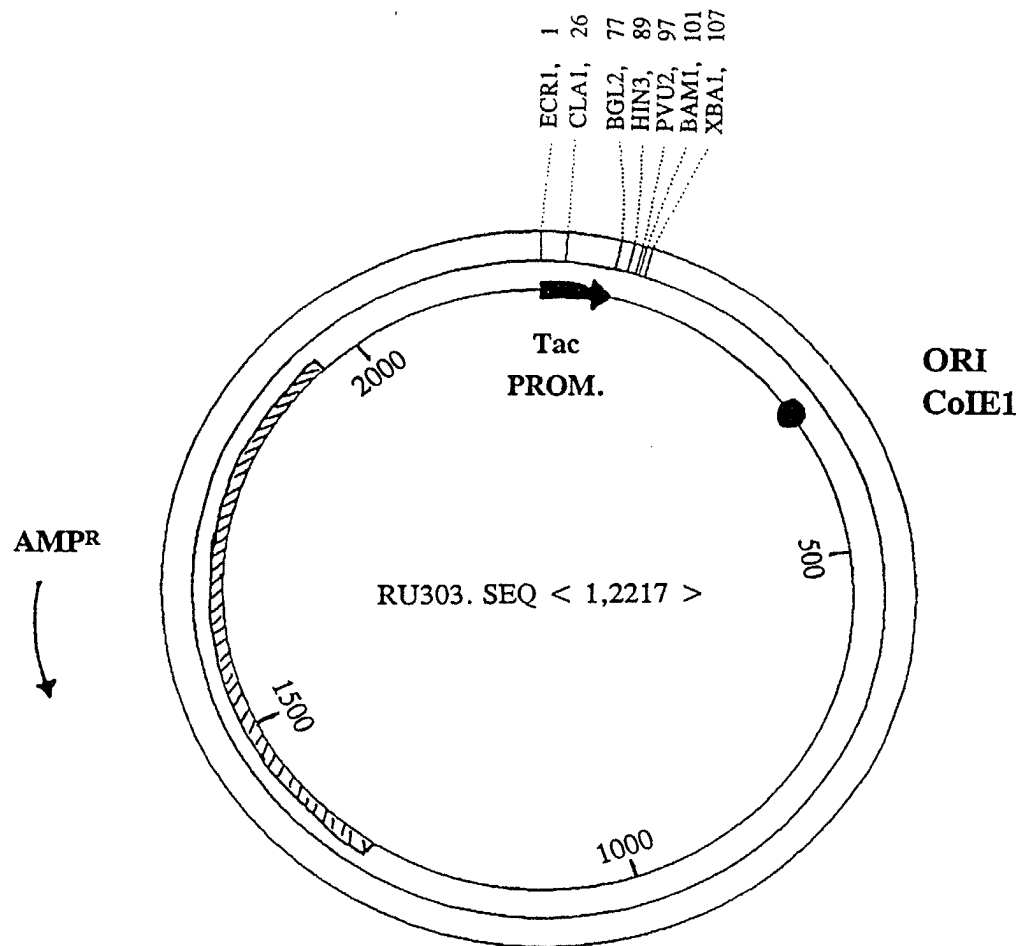


Figure 5

7/16

E  
 C  
 R  
 1

C  
 L  
 A  
 1

GAATTCAGTATTGACAATTTATACATCGATATGGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGAT  
 ----.----+----.----+----.----+----.----+----.----+ 60  
 CTTAAGTCATAACTGTTAAATATGTAGCTATACCATATTACACACCTTAACACTCGCCTA

B  
 G  
 L  
 2

H  
 I  
 N  
 3

P  
 V  
 U  
 2

B  
 A  
 M  
 1

X  
 B  
 A  
 1

S  
 A  
 L  
 1

AACAAATTCACACAGGAGATCTGCAGGTAAGCTTCAGCTGGGATCCTCTAGAGTCGACGT  
 ----.----+----.----+----.----+----.----+----.----+ 120  
 TTGTTAAAGTGTGTCCTCTAGACGTCCATTCTGAAGTCGACCCTAGGAGATCTCAGCTGCA

N  
 D  
 E  
 1

GAAAAATGGCGCACATTGTGCGACATTTTTTTTGTGCATATG  
 ----.----+----.----+----.----+----.----+ 161  
 CTTTTTACCGCGTGTAAACACGCTGTAAAAAAACAGTATAC

Figure 6

8/16

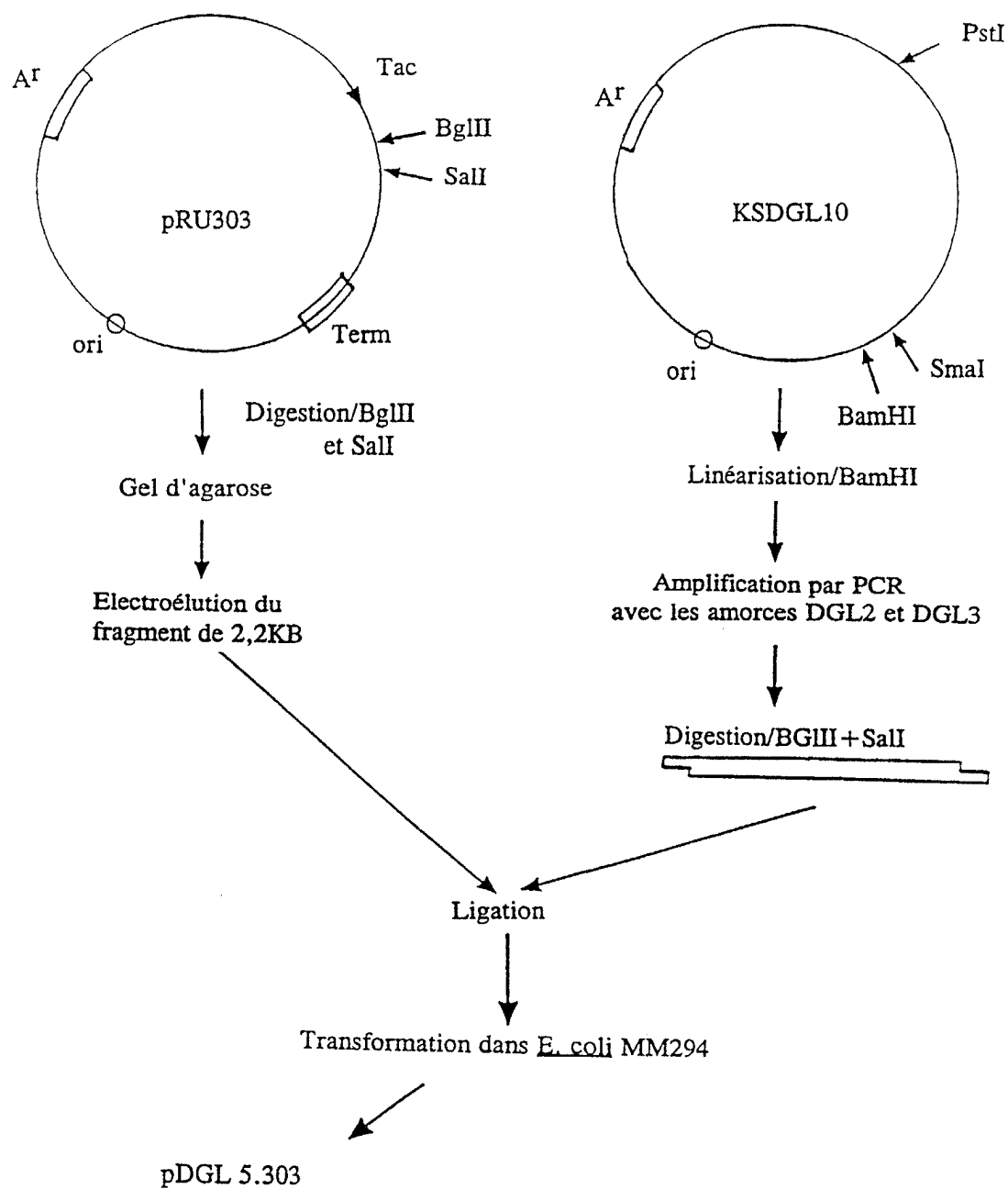


Figure 7

9/16

v10	v20	v30	v40	v50	v60	v70
TTGTTTGGAA	AATTACATCC	CACAAACCCT	GAAGTGACCA	TGAATCTAAG	TCAGATGATC	ACCTACTGGG
v80	v90	v100	v110	v120	v130	v140
GATACCCAGC	TGAGGAATAT	GAAGTTGTGA	CCGAAGACGG	TTATATCCTT	GGGATCGACA	GAATTCCTTA
v150	v160	v170	v180	v190	v200	v210
TGGGAGGAAA	AATTCAGAGA	ATATAGGCCG	GAGACCTGTT	GCATTTTTCG	AACACGGTTT	GCTCGCATCA
v220	v230	v240	v250	v260	v270	v280
GCCACAAACT	GGATCTCCAA	CCTGCCCAAC	AACAGCCTGG	CCTTCATCCT	GGCCGACGCC	GGGTACGACG
v290	v300	v310	v320	v330	v340	v350
TGTGGCTGGG	GAACAGCAGG	GGCAACACCT	GGGCCAGGAG	GAATCTGTAC	TACTCGCGAC	CCTCCGTCGA
v360	v370	v380	v390	v400	v410	v420
ATTCTGGGCT	TTGAGCTTTG	ACGAGATGGC	TAAATATGAC	CTTCCCGCCA	CCATTGACTT	CATCTTGAAG
v430	v440	v450	v460	v470	v480	v490
AAAACGGGAC	AGGACAAGCT	ACACTACGTT	GGCCATTCCC	AGGGCACCAC	CATTGGTTTC	ATCGCCTTTT
v500	v510	v520	v530	v540	v550	v560
CCACCAATCC	CAAGCTGGCG	AAACGGATCA	AAACCTTCTA	TGCATTAGCT	CCCCTTGCCA	CCGTGAAGTA
v570	v580	v590	v600	v610	v620	v630
CACCGAAACC	CTGTAAACA	AATCATGCT	CGTCCCTTCG	TTCCTCTTCA	AGCTTATATT	TGGAAACAAA
v640	v650	v660	v670	v680	v690	v700
ATATTCTACC	CACACCACTT	CTTTGATCAA	TTTCTCGCCA	CCGAGGTATG	CTCCCGCGAG	ACGGTGGATC
v710	v720	v730	v740	v750	v760	v770
TCCTCTGCAG	CAACGCCCTG	TTTATCATTT	GTGGATTGTA	CACTATGAAC	TTGAACATGA	GTCCGTTGGA
v780	v790	v800	v810	v820	v830	v840
TGTGTATCTG	TCACATAATC	CAGCAGGAAC	ATCGGTTTCG	AACGTGCTCC	ACTGGTCCCA	GGCTGTTAAG
v850	v860	v870	v880	v890	v900	v910
TCTGGGAAGT	TCCAAGCTTT	TGACTGGGGA	AGCCAGTTTC	AGAACATGAT	GCACTATCAT	CAGAGCATGC
v920	v930	v940	v950	v960	v970	v980
CTCCCTACTA	CAACCTGACA	GACATGCATG	TGCCAATCGC	AGTGTGGAAC	GGTGGCAACG	ACTTGCTGGC
v990	v1000	v1010	v1020	v1030	v1040	
CGACCCTCAC	GATGTTGACC	TTTTGCTTTC	CAAGCTCCCC	AATCTCATTT	ACCACAGGAA	GATTCCTCCT
v1060	v1070	v1080	v1090	v1100	v1110	
TACAATCACT	TGGACTTTAT	CTGGGCCATG	GATGCCCCCT	AAGCGGTTTA	CAATGAAATT	GTTTCATGA
v1130	v1140	v1150	v1160	v1170	v1180	
TGGGAACAGA	TAATAAGTAG	TTCTAGATTT	AAGGAATTAT	TCTTTATTGG	TTCCAAAATA	CGTTCTTCTC
v1200	v1210	v1220	v1230	v1240	v1250	
TCACACGTGG	TTTCTATCA	TGTTTGAGAC	ACGGTGATTG	TTCCCATGGT	TTTGATTTC	GAAATGTGTT
v1270	v1280	v1290	v1300	v1310	v1320	
AGCATCAACA	ATCTTTCCAT	TGGTAATTTT	TGAATTTAAA	ATGATTTTAA	AATTTGGGGC	ATCTGGGTGG
v1340	v1350	v1360	v1370	v1380	v1390	
CTCAGTTGGC	TAAGTCGTCT	GCCTTGGCTT	AAGTCATGAT	CTCGGGGTCC	TAGGATGGAG	CCTTGTGTCT
v1410	v1420	v1430	v1440	v1450	v1460	
GGGCTCCTGC	CGGGCGGGGG	GTCTGCTTCT	CCTCCTGCTG	CTCCCCCTCG	CTGCTGTGTG	CACACACGCT
v1480	v1490	v1500	v1510	v1520		
CTCTCTCTCT	CAATAAATA	AATAAATAA	TACTTAATAA	AATAAAAAA	AAAAAAA	
v1550						

Figure 8

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

10/16

-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
1	Leu	Phe	Gly	Lys	Leu	His	Pro	Thr	Asn	Pro	10
11	Glu	Val	Thr	Met	Asn	Leu	Ser	Gln	Met	Ile	20
21	Thr	Tyr	Trp	Gly	Tyr	Pro	Ala	Glu	Glu	Tyr	30
31	Glu	Val	Val	Thr	Glu	Asp	Gly	Tyr	Ile	Leu	40
41	Gly	Ile	Asp	Arg	Ile	Pro	Tyr	Gly	Arg	Lys	50
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
51	Asn	Ser	Glu	Asn	Ile	Gly	Arg	Arg	Pro	Val	60
61	Ala	Phe	Leu	Gln	His	Gly	Leu	Leu	Ala	Ser	70
71	Ala	Thr	Asn	Trp	Ile	Ser	Asn	Leu	Pro	Asn	80
81	Asn	Ser	Leu	Ala	Phe	Ile	Leu	Ala	Asp	Ala	90
91	Gly	Tyr	Asp	Val	Trp	Leu	Gly	Asn	Ser	Arg	100
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
101	Gly	Asn	Thr	Trp	Ala	Arg	Arg	Asn	Leu	Tyr	110
111	Tyr	Ser	Arg	Pro	Ser	Val	Glu	Phe	Trp	Ala	120
121	Phe	Ser	Phe	Asp	Glu	Met	Ala	Lys	Tyr	Asp	130
131	Leu	Pro	Ala	Thr	Ile	Asp	Phe	Ile	Leu	Lys	140
141	Lys	Thr	Gly	Gln	Asp	Lys	Leu	His	Tyr	Val	150
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
151	Gly	His	Ser	Gln	Gly	Thr	Thr	Ile	Gly	Phe	160
161	Ile	Ala	Phe	Ser	Thr	Asn	Pro	Lys	Leu	Ala	170
171	Lys	Arg	Ile	Lys	Thr	Phe	Tyr	Ala	Leu	Ala	180
181	Pro	Val	Ala	Thr	Val	Lys	Tyr	Thr	Glu	Thr	190
191	Leu	Leu	Asn	Lys	Leu	Met	Leu	Val	Pro	Ser	200
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
201	Phe	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Phe	Gly	Asn	Lys	210
211	Ile	Phe	Tyr	Pro	His	His	Phe	Phe	Asp	Gln	220
221	Phe	Leu	Ala	Thr	Glu	Val	Cys	Ser	Arg	Glu	230
231	Thr	Val	Asp	Leu	Leu	Cys	Ser	Asn	Ala	Leu	240
241	Phe	Ile	Ile	Cys	Gly	Phe	Asp	Thr	Met	Asn	250
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
251	Leu	Asn	Met	Ser	Arg	Leu	Asp	Val	Tyr	Leu	260
261	Ser	His	Asn	Pro	Ala	Gly	Thr	Ser	Val	Gln	270
271	Asn	Val	Leu	His	Trp	Ser	Gln	Ala	Val	Lys	280
281	Ser	Gly	Lys	Phe	Gln	Ala	Phe	Asp	Trp	Gly	290
291	Ser	Pro	Val	Gln	Asn	Met	Met	His	Tyr	His	300
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
301	Gln	Ser	Met	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Asn	Leu	Thr	310
311	Asp	Met	His	Val	Pro	Ile	Ala	Val	Trp	Asn	320
321	Gly	Gly	Asn	Asp	Leu	Leu	Ala	Asp	Pro	His	330
331	Asp	Val	Asp	Leu	Leu	Leu	Ser	Lys	Leu	Pro	340
341	Asn	Leu	Ile	Tyr	His	Arg	Lys	Ile	Pro	Pro	350
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
351	Tyr	Asn	His	Leu	Asp	Phe	Ile	Trp	Ala	Met	360
361	Asp	Ala	Pro	Gln	Ala	Val	Tyr	Asn	Glu	Ile	370
371	Val	Ser	Met	Met	Gly	Thr	Asp	Asn	Lys		379

Figure 9A

11/16

84.7% identité

	10v	20v	30v	40v	50v	60v
DGLM	LFGKLHPTNPEVTMNL	SQMITYWGYPAEEYEVV	TEDGYILGIDRIPYGRKNS	ENIGRRPVA		
	LFGKLHP.	:PEVTMN:SQMITYWGYP.	EEYEVV	TEDGYIL.:	RIPYG:KNS.N.G:RPV.	
HGL	LFGKLHPGSPEVTMNI	SQMITYWGYPNEEYEVV	TEDGYILEVNRIPY	GKKNSGNTG	QRPVV	
	30^	40^	50^	60^	70^	80^
	70v	80v	90v	100v	110v	120v
DGLM	FLQHGLLASATN	WISNLPNNSLAFILADAGY	DVWLGNSRGNTWARRN	LYYSRPSVEFWAFS		
	FLQHGLLASATN	WISNLPNNSLAFILADAGY	DVWLGNSRGNTWARRN	LYYS.SVEFWAFS		
HGL	FLQHGLLASATN	WISNLPNNSLAFILADAGY	DVWLGNSRGNTWARRN	LYYSPDSVEFWAFS		
	90^	100^	110^	120^	130^	140^
	130v	140v	150v	160v	170v	180v
DGLM	FDEMAKYDLPATIDFI	LKKTGQDKLHYVGHSQ	GTTIGFIAFSTNP	KLAKRIKTFYALAPVA		
	FDEMAKYDLPATIDFI	:KKTGQ.:LHYVGHSQ	GTTIGFIAFSTNP.	LAKRIKTFYALAPVA		
HGL	FDEMAKYDLPATIDFI	VKKTGQKQLHYVGHSQ	GTTIGFIAFSTNP	SLAKRIKTFYALAPVA		
	150^	160^	170^	180^	190^	200^
	190v	200v	210v	220v	230v	240v
DGLM	TVKYTETLLNKLM	LVPSFLFKLIFGNK	KIFYPHHFFDQFLATEV	CSRETVDLLCSNALFIIC		
	TVKYT.:L:NKL.:VP	LFK:IFG:KIFYPH:	FFDQFLATEVCSRE	::LLCSNALFIIC		
HGL	TVKYTKSLINKLR	FVPSLFKFIFGDK	KIFYPHNFFDQFLATEV	CSREMLNLLCSNALFIIC		
	210^	220^	230^	240^	250^	260^
	250v	260v	270v	280v	290v	300v
DGLM	GFDTMNLNMSRLD	VYLSHNPAGTSVQNV	LHWSQAVKSGKFQAF	DWGSVPVQNMH	YHQSMPP	
	GFD:.N:N SRLD	VYLSHNPAGTSVQNV:	HW:QAVKSGKFQAF:	DWGSVPVQNV.MHY:QS	PP	
HGL	GFDSKNFNTSRLD	VYLSHNPAGTSVQNM	PHWTQAVKSGKFQAF	DWGSVPVQNMH	YDQSQPP	
	270^	280^	290^	300^	310^	320^
	310v	320v	330v	340v	350v	360v
DGLM	YYNLTDHVP	PIAVWNGGNDLLADPH	DVLLSKLPNLIYH	RKIPYNHLD	FIWAMDAPQAV	
	YYN:T.M:VPIAVWNGG:	DLLADP:DV:LLL:KLPNLIYH:	.IP	YNHLD	FIWAMDAPQ.V	
HGL	YYNVTAMNVPIAVW	NGGKDLLADPQDVGL	LLPKLPNLIYHKE	IPFYNHLD	FIWAMDAPQEV	
	330^	340^	350^	360^	370^	380^
	370v					
DGLM	YNEIVSMMGTDNK					
	YN:IVSM:..D:K					
HGL	YNDIVSMISEDKK					
	390^					

Figure 9B

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

12/16

75.7% identité

	10v	20v	30v	40v	50v	60v
DGLM	LFGKLHPTNPEVTMNL	SQMITYWGYP	AEYEVV	TEDGYILG	IDRIPYGRK	NSENIGRRPVA
	LFGKL	P.NPE..MN:	SQMITYWGYP	:EYEVV	TEDGYILG:	RIP.G::NSENIG:RPV.
RATLL	LFGKLGPGNPEANMNISQMITYWGYP	QCEYEVV	TEDGYILGVYRIP	PHGKN	NSENIGKRPV	
	40^	50^	60^	70^	80^	90^
	70v	80v	90v	100v	110v	120v
DGLM	FLOHGLLASATN	WISNLPNNSLAF	LADAGYDVWLGN	SRGNTWARRN	LYYSRPSVEFWAFS	
	:LQHGL:ASATN	WI:NLPNNSLAF:	LADAGYDVWLGN	SRGNTW:R:N:YYS.	SVEFWAFS	
RATLL	YLQHGLIASATN	WIANLPNNSLAF	MLADAGYDVWLGN	SRGNTWSRKNVY	YSPDSVEFWAFS	
	100^	110^	120^	130^	140^	150^
	130v	140v	150v	160v	170v	180v
DGLM	FDEMAKYDLPATID	FILKKTGQDKLHYV	GHSQGGTIGFIA	FSTNPKLAKRIK	TFYALAPVA	
	FDEMAKYDLPATI:	FI::KTGQ:K:HYV	GHSQGGTIGFIA	FSTNP.LAK:IK	TFYALAPVA	
RATLL	FDEMAKYDLPATIN	FIVQKTGQEKIHYV	GHSQGGTIGFIA	FSTNP	TLAKKIKTFYALAPVA	
	160^	170^	180^	190^	200^	210^
	190v	200v	210v	220v	230v	240v
DGLM	TVKYTETLLNK	MLVPSFLFKLIF	GNKIFYPH	FFDQFLATEVCS	RETVDLLCSN	ALFIIC
	TVKYT::L:K::P:	FLFKL:FG:K:F	PH:FD:FL:	TEVCSRE::DLLCSN:	LFI:C	
RATLL	TVKYTQSPLKKIS	FIPFLLFKLMFG	KMFLPHTYFDD	FLGTEVCSRE	VLDLLCSNTL	FIFC
	230^	240^	250^	260^	270^	
	250v	260v	270v	280v	290v	300v
DGLM	GFDTMNLNMSRLD	VYLHNPAGTSVQ	NVLHWSQAVKSG	KFQAFDWGSPVQ	NMMHYHQSMP	PP
	GFD..NLN:SR:	DVYL:HNPAGTSVQ:	LHW:Q V:SGK	FQAF:WGSP QNM:HY:Q.	PP	
RATLL	GFDKKNLNVSR	FDVYLGHNPAGTSVQ	DFLHWAQLVRS	GKFAFNWGSPS	QNMMLHYNQK	TPP
	290^	300^	310^	320^	330^	
	310v	320v	330v	340v	350v	360v
DGLM	YYNLTDHVP	IAVWNGGNDLL	ADPHDVL	LLSKLPNLIYHR	KIPPYNHLD	FIWAMDAPQAV
	Y:::..M VP:	AVWNGGND:LADP:	DV::LL:KL:NL::H::I	:YNHLD	FIWAMDAPQ.V	
RATLL	EYDVSAMTVP	VAVWNGGNDIL	ADPDVAMLLPK	LSNLLFHKEI	LAYNHLD	FIWAMDAPQEV
	350^	360^	370^	380^	390^	400^
	370v					
DGLM	YNEIVSMMGTDNK					
	YNE::SMM:.D.K					
RATLL	YNEMISMAED					
	410^					

Figure 9C

13/16

81.0% identité

	10v	20v	30v	40v	50v	60v
DGLM	LFGKLHPTNPEVTMNL	SQMITYWGYP	AEYEVV	TEDGYIL	GIDRIPYGRK	NSENIGRRPVA
	LFGK	PTNPEV.MN:	SQMI:YWGYP:	E.YEVV	TEDGYIL.:	RIPYG:KNS.N G:RPV.
RGLM	LFGKSAPTNP	EVNMNISQMI	SYWGYP	SEKYEVV	TEDGYILEVN	RIPYGGKNSGNRGRPVV
	10^	20^	30^	40^	50^	60^
	70v	80v	90v	100v	110v	120v
DGLM	FLQHGLLASATN	WISNLPNNSLA	FILADAGYD	VWLGNSRGNT	WARRNLYYSR	PSVEFWAFS
	FLQHGLLASA:	NWISNLPNNSLA	FILADAGY:	VWLGNSRGNTW:	RRNLYYS.	SVEFWAFS
RGLM	FLQHGLLASAS	NWISNLPNNSLA	FILADAGYGV	WLGNSRGNTWS	RRNLYYSPDS	VEFWAFS
	70^	80^	90^	100^	110^	120^
	130v	140v	150v	160v	170v	180v
DGLM	FDEMAKYDLP	TIDFILKKTG	QDKLHYVGH	SQGTIGFIAF	STNPKLAKRI	KTFYALAPVA
	FDEMAKYDLP	TIDFI:K.TGQ:	KLHYVGH	SQGTIGFIAF	STNPKLA.	RIKTFYALAPVA
RGLM	FDEMAKYDLP	TIDFIVKETG	QEKLHYVGH	SQGTIGFIAF	STNPKLAER	IKTFYALAPVA
	130^	140^	150^	160^	170^	180^
	190v	200v	210v	220v	230v	240v
DGLM	TVKYTETLLN	KMLVPSFL	FKLIFGNK	FIFYPHFFD	QFLATEVCS	RETVDLLCSN
	TVKYT.:L:NKL.:	P: :FK:IFG:	KIFYPH:	FFDQFLAT:	VCSRET::	:CSNALFIIC
RGLM	TVKYTKSLVN	KLRFIPPTM	FKIIFGDK	FIFYPHFFD	QFLATQVCS	RETLNVICSN
	190^	200^	210^	220^	230^	240^
	250v	260v	270v	280v	290v	300v
DGLM	GFDTMNLN	MSRLDVYL	SHNPAGTSV	QNVLHWSQ	AVKSGKFQ	AFDWGSPVQ
	GFD: NLNMSRL	DVY:SHNPAGTSV	QN:LHW:Q	AVKSG:FQAF:	WGSP.QN::	H::Q: PP
RGLM	GFDSANLN	MSRLDVYV	SHNPAGTSV	QNMHLWTQ	AVKSGNFQ	AFNWGSPAQ
	250^	260^	270^	280^	290^	300^
	310v	320v	330v	340v	350v	360v
DGLM	YYNLTD	MHVPIAVW	NGGNDLL	ADPHD	VDLLLSKL	PNLIYHRKIP
	YYN:T.M:V	PIAVW:GGND	LADP:DVD	LLLSKL:	NLIYH:.I	PYNHLD
RGLM	YYNVTAMN	VPIAVW	SGGNDWL	ADPDVD	LLLPKLSN	LIYHKEILP
	310^	320^	330^	340^	350^	360^
	370v					
DGLM	YNEIVS	MMGTDNK				
	YNEI:	SMM:.D:	K			
RGLM	YNEIIS	MMMAKDKK				
	370^					

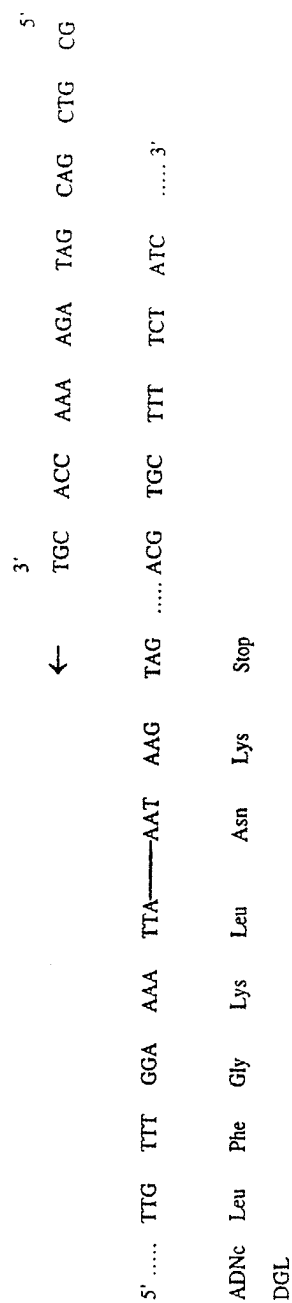
Figure 9D

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

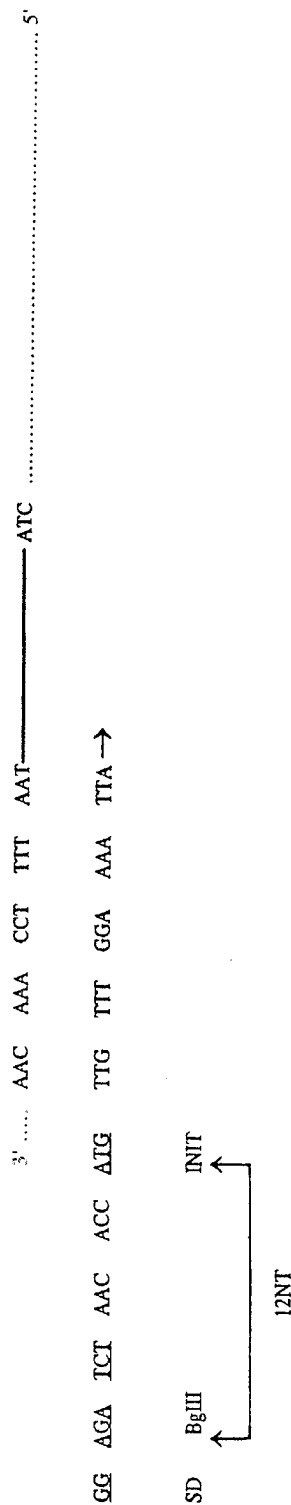


14/16

Amorce DGL3



Amorce DGL2



SD = Shine et Dalgarno

NT = Nucléotides

INIT = Site d'initiation

Figure 10

15/16

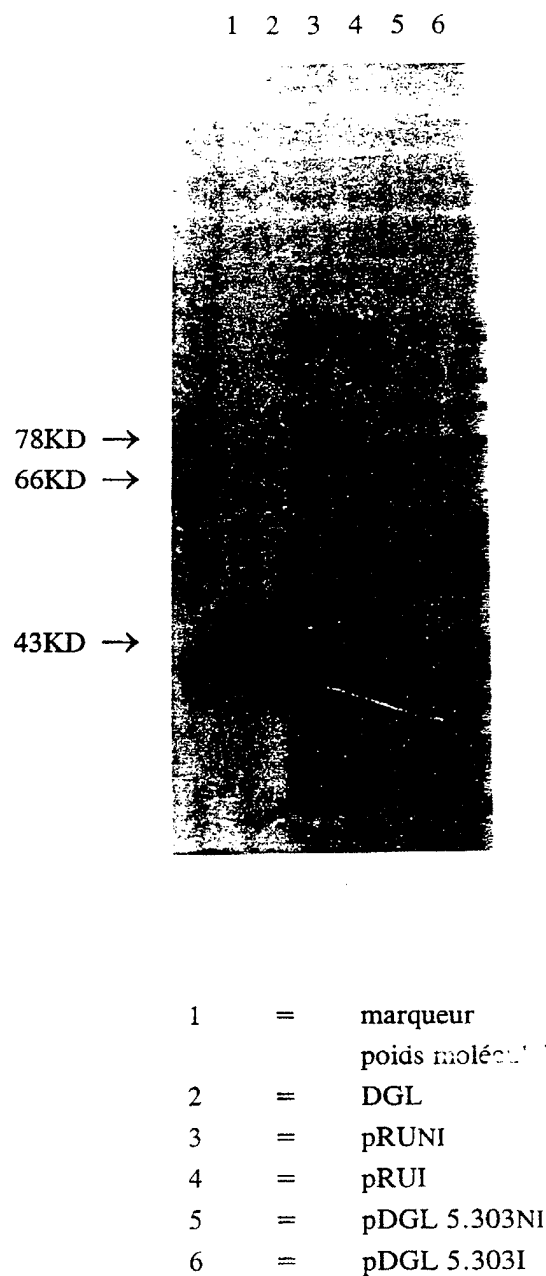
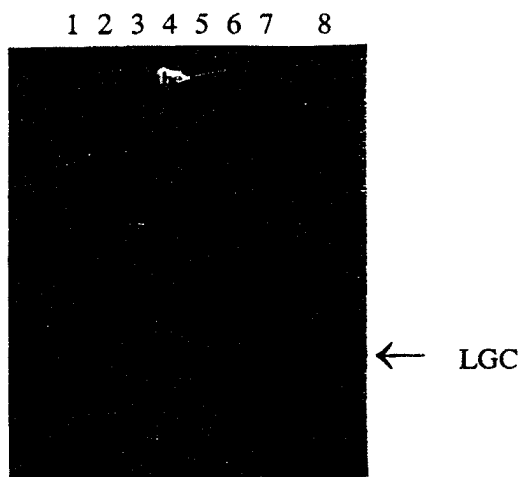


Figure 11

16/16



- |   |   |              |
|---|---|--------------|
| 1 | = | LGL          |
| 2 | = | pRGL NC1.3I  |
| 3 | = | pRGL NC1.3NI |
| 4 | = | pRUI         |
| 5 | = | pRUNI        |
| 6 | = | pDGL 5.303I  |
| 7 | = | pDGL 5.303NI |
| 8 | = | LGC          |

Figure 12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/FR 93/01260

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 C12N15/55 C12N1/21 A61K37/54 C12N11/00 C12N9/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY vol. 202 , 1991 pages 75 - 83 CARRIERE F. ET AL 'Purification and biochemical characterization of dog gastric lipase' cited in the application	12-13
Y	see the whole document ---	1-4, 6-11, 14-19
Y	EP,A,0 261 016 (JOUVEINAL S. A.) 23 March 1988 cited in the application see page 17, line 15 - line 39; claims --- -/--	1-4, 6-11, 14-19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 April 1994

Date of mailing of the international search report

20. 05. 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Cornec, N

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
FR 93/01260

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,86 01532 (CELL-TECH LIMITED) 13 March 1986	5
Y	<p>see page 2, line 14 - page 4, line 15  see page 20, line 12 - page 24, line 10  see claims; figure 3</p> <p>---</p>	1-4, 6-11, 14-19
A	<p>DE,A,37 37 333 (BASF AG) 18 May 1989  see abstract; claims</p> <p>---</p>	20
A	<p>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA  vol. 1083, no. 1, 1991  pages 109 - 119  S. J. IVERSON ET AL 'Milk lipid  digestion in the neonatal dog : the  combined actions of gastric and bile salt  stimulated lipases'</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l Application No  
PCT/FR 93/01260

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0261016	23-03-88	FR-A- 2603804	18-03-88
		AU-B- 602349	11-10-90
		AU-A- 7795687	24-03-88
		DE-A- 3784607	15-04-93
		DE-T- 3784607	07-10-93
		JP-A- 63079589	09-04-88
		US-A- 5075231	24-12-91
		ZA-A- 8706322	02-03-88
-----			
WO-A-8601532	13-03-86	EP-A, B 0191061	20-08-86
		GB-A, B 2176489	31-12-86
		JP-T- 61503035	25-12-86
-----			
DE-A-3737333	18-05-89	NONE	
-----			

# Grosset-Fournier & Demachy s.a.r.l.

Propriété Industrielle

Membre du G.I.E. PA & GD

## CONFIRMATION

Grosset-Fournier & Demachy s.a.r.l.

Charles DEMACHY  
Pharmacien  
diplôme du CEIPI (brevets, marques, modèles)

Catherine GROSSET-FOURNIER  
Ingénieur ENSCP  
Mandataire Européen  
diplômée du CEIPI (brevets, marques, modèles)

REQUETE EN RECTIFICATION  
SELON LA REGLE 91.1(f)

Autre membre du G.I.E.:

Pontet & Allano s.a.r.l.

Sylvain ALLANO  
Docteur ès Sciences  
Professeur des Universités

Bernard PONTET  
Ingénieur INSA  
Conseil en Brevets d'Invention  
Mandataire Européen  
diplômé du CEIPI (brevets, marques, modèles)

### TELECOPIE

v. réf.:

n. réf.:

Paris, le:

WOB 92 AY JOU LGC

11 avril 1994

Office Européen des Brevets  
Département de La Haye  
Patentlaan 2  
Postbus 5818  
NL-2280 HV Rijswijk  
Pays-Bas

**Objet:** Demande internationale n° PCT/FR 93/01260, déposée le 16 décembre 1993  
**Priorité:** FR n° 92. 15201 du 16 décembre 1992  
**Titulaire:** Institut de Recherche Jouveinal  
**Pour:** "Lipase gastrique de chien"  
Demande de corrections des séquences nucléotidique et peptidique de la lipase  
gastrique de chien décrite dans cette demande internationale.

Messieurs,

La Société Demanderesse requiert par la présente, conformément à la  
règle 91 du PCT, que la séquence nucléotidique pour la lipase gastrique  
de chien (LGC) décrite sur la figure 8 de la présente demande, de même que la  
séquence peptidique correspondant à la LGC et décrite sur la figure 9A de cette  
même demande, soient corrigées de la manière suivante:

GROSSET-FOURNIER & DEMACHY

103, rue La Fayette  
75010 PARIS (France)

Tél.: (33.1) 42 81 09 58 - Télécopie: (33.1) 42 81 08 71  
S.A.R.L. au capital de 50.000 F - R.C.S. Paris B 385 020 375

PONTET & ALLANO

25, rue Jean-Rostand - Parc Club Orsay Université  
91893 ORSAY Cedex (France)

Tél.: (33.1) 69 33 21 21 - Télécopie: (33.1) 69 41 95 88  
S.A.R.L. au capital de 50.000 F - R.C.S. Corbeil-Essonnes B 385 288

1) séquence nucléotidique représentée sur la figure 8:

- en position 46: "C" doit être remplacé par "A",
- en position 338: "G" doit être remplacé par "C",
- en position 339: "A" doit être remplacé par "C",
- en position 340: "C" doit être remplacé par "G",
- en position 341: "C" doit être remplacé par "A",

2) séquence peptidique représentée sur la figure 9A:

- position 16: "Leu" doit être remplacé par "Ileu",
- position 113: "Arg" doit être remplacé par "Pro",
- position 114: "Pro" doit être remplacé par "Asp".

Vous trouverez ci-après les raisons qui militent en faveur d'un accord de l'Office Européen des Brevets en tant qu'administration chargée de la recherche internationale, au sujet de cette requête en correction.

Tout d'abord, s'agissant des corrections à apporter à la séquence nucléotidique représentée sur la figure 8, nous nous permettons dans un premier temps de rappeler, dans ses grandes lignes, la méthode utilisée pour le séquençage d'une séquence nucléotidique dans le cadre de cette demande de brevet.

Cette méthode est celle décrite par Sanger et al. 1977; la référence de cette publication est indiquée à la page 14, lignes 26 à 28 de la présente demande. Le principe général de cette méthode est essentiellement celui de l'incorporation d'un didésoxynucléotide dans un brin d'ADN en voie d'élongation (selon les techniques classiques d'élongation d'un brin d'ADN à partir du brin



complémentaire), ledit didésoxynucléotide arrêtant l'allongement ultérieur du brin d'ADN, puisqu'il ne peut pas former de liaisons phosphodiester avec le nucléotide suivant.

Les différentes étapes de cette méthode sont représentées sur le schéma 1 annexé à la présente (annexe I), et qui peut être commenté de la manière suivante.

Dans un premier tube à essai, on effectue une élongation d'une séquence monocaténaire que l'on souhaite analyser avec une amorce marquée radioactivement en présence d'ADN polymérase, de chacun des quatre désoxynucléotides dATP, dGTP, dCTP, dTTP, le désoxynucléotide dATP étant généralement présent en plus faible quantité que les trois autres dans le milieu réactionnel, et en présence du didésoxynucléotide ddATP. Chaque fois qu'un ddATP sera utilisé pour être apparié à un résidu T sur la séquence monocaténaire, l'élongation est alors arrêtée. On obtient tous les fragments possibles de la séquence que l'on souhaite analyser se terminant par un résidu T. Cette même opération est répétée dans les trois autres tubes à essai par mise en présence dans chaque tube d'un didésoxynucléotide (ddCTP, ddTTP, ddGTP), différent avec la séquence monocaténaire, l'ADN polymérase, l'amorce et les 4 désoxynucléotides (dCTP, dTTP, dGTP étant respectivement en quantité plus faible). On obtient ainsi tous les fragments possibles de la séquence que l'on souhaite analyser se terminant par un résidu G, un résidu A et un résidu C respectivement.

Les fragments de différente taille ainsi obtenus dans chaque tube, sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel. On obtient ainsi quatre colonnes de bandes sur le gel, chaque colonne correspondant respectivement aux fragments se terminant par un résidu T, G, A et C. Les fragments de plus grande taille sont situés en haut des colonnes, tandis que les fragments les plus petits sont situés en bas de ces colonnes.

La séquence d'ADN que l'on souhaite analyser est ensuite lue de bas en haut sur le gel.

Ainsi sur l'exemple représenté sur le schéma 1, le premier fragment marqué correspondant à l'amorce (utilisée pour l'élongation) allongée d'un nucléotide, se termine par un résidu C; le nucléotide correspondant sur la séquence d'ADN matrice est donc un résidu G. Le second fragment marqué que l'on peut lire en remontant vers le haut se termine par un résidu G; le second nucléotide correspondant sur la séquence d'ADN matrice est donc un résidu C. Le troisième fragment marqué que l'on peut lire en remontant vers le haut se termine par un résidu A; le troisième nucléotide correspondant sur la séquence d'ADN matrice est donc un résidu T; etc...

La séquence d'ADN que l'on souhaite analyser est ainsi obtenue en lisant ces bandes de gel, et en traduisant cette lecture pour avoir la séquence nucléotidique de l'ADN en question.

Une alternative consiste à copier le brin complémentaire du brin codant, puis à séquencer ce brin complémentaire. On lit alors directement sur le gel la séquence du brin codant.

Vous trouverez ci-joint en annexe II et annexe III, les gels d'électrophorèse à partir desquels la séquence de l'ADNc codant pour la LGC a été obtenue, selon cette deuxième modalité (séquençage du brin complémentaire).

Vous noterez tout d'abord que ces gels d'électrophorèse sont en réalité beaucoup moins présentables que celui schématisé en annexe I, et que leur lecture est donc extrêmement délicate.

Vous comprendrez donc aisément que, lors de la lecture de ces gels, des erreurs peuvent facilement survenir.

Ces gels sont lus à l'oeil nu par l'opérateur, qui par la suite transcrit cette lecture sur une feuille de papier, et enfin saisit sur ordinateur les résultats figurant sur cette feuille de papier.

L'ensemble de ces opérations peut donc engendrer trois sources d'erreurs possibles:

- erreur à la lecture de la séquence sur le gel,
- erreur lors de la transcription sur le papier de la séquence lue,
- erreur lors de la saisie sur ordinateur.

Dans le cas présent, les erreurs survenues entre la lecture et la saisie informatique des gels représentant la séquence nucléotidique de la LGC décrite dans la présente demande, apparaissent clairement à l'analyse des gels en annexes II et III.

S'agissant du gel représenté en annexe II, la lecture des nucléotides situés aux positions 37 à 51, donne la séquence suivante:

A	C	C	A	T	G	A	A	T	A	T	A	A	G
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50

Un agrandissement du gel représenté sur l'annexe II (annexe IV) ainsi qu'une représentation schématique de la séquence de la LGC entre les nucléotides 37 et 51 telle qu'elle apparaît sur le gel de l'annexe II (annexe V), sont également joints à la présente dans le but de faciliter l'interprétation du gel susmentionné.

On s'aperçoit donc que le nucléotide situé en position 46 sur le gel est sans ambiguïté possible un résidu "A" et non un résidu "C".

S'agissant du gel représenté en annexe III, la lecture des nucléotides situés aux positions 329 à 345, donne la séquence suivante:

A	C	T	A	C	T	C	G	C	C	C	G	A	C	T	C	C
329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	349	340	341	342	343	344	345

Un agrandissement du gel représenté sur l'annexe III (annexe VI) ainsi qu'une représentation schématique de la séquence de la LGC entre les nucléotides 329 à 345 telle qu'elle apparaît sur le gel de l'annexe III (annexe

VII), sont également joints à la présente dans le but de faciliter l'interprétation du gel susmentionné.

On constate également sans ambiguïté que la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 338 à 341, correspond à la séquence "C-C-G-A" et non à la séquence "G-A-C-C".

S'agissant de cette dernière erreur de lecture, on s'aperçoit que l'opérateur a fait une inversion mentale entre les termes "C-C" et "G-A" lors de la transcription sur papier de la séquence lue.

Ainsi, compte tenu des techniques décrites dans le cadre du séquençage de fragments d'ADN, il est clair que les erreurs susceptibles de survenir dans les séquences d'ADN, sont des erreurs totalement aléatoires et qui sont fonctions de la vigilance de l'opérateur en charge des opérations susmentionnées de lecture, de transcription sur papier et de saisie sur informatique.

Notez à ce sujet, que l'ensemble de ces opérations dans le cadre du séquençage de la LGC, représente une charge de travail pour l'opérateur d'environ 3 jours. Vous constaterez ainsi qu'il s'agit d'une mission autant minutieuse que lourde à effectuer, et que des erreurs peuvent facilement survenir.

Il convient par ailleurs de constater que si l'on répète scrupuleusement les opérations de clonage de la séquence d'ADNc codant pour la LGC, telles que décrites de la page 12 à la page 18 de la présente demande de brevet, on ne peut qu'obtenir les gels représentés en annexes II et III, et par conséquent, la séquence nucléotidique correcte de la LGC, dans la mesure, bien entendu, où l'opérateur ne commet pas d'erreur lors de la lecture de ces gels.

Ainsi, conformément à la décision de la Grande Chambre de recours G11/91 de l'O.E.B., rendue dans un cas similaire à celui faisant l'objet de la présente demande de corrections, la présente demande doit pouvoir être corrigée de la manière indiquée ci-dessus, dans la mesure où l'homme du métier était objectivement capable, à la date de dépôt de la présente demande, de déduire

directement et sans équivoque du contenu de la susdite demande, les séquences nucléotidique et peptidique correctes de la LGC.

Comme le souligne la susdite décision, *"Une telle correction revêt uniquement le caractère d'une constatation et ne transgresse donc pas l'interdiction d'étendre l'objet d'une demande de brevet visée à l'article 123(2) CBE"*.

S'agissant des erreurs survenues dans la séquence peptidique de la LGC, représentée sur la figure 9A de la présente demande, il est clair que celles-ci sont directement liées aux erreurs susmentionnées contenues dans la séquence nucléotidique.

Ainsi, les nucléotides situés aux positions 46 à 48, à savoir "A-T-A" dans la séquence nucléotidique correcte, codent pour une isoleucine (Ileu) en position 16 de la séquence peptidique, et non pour une leucine (Leu).

Par ailleurs, les nucléotides situés aux positions 337 à 342 dans la séquence nucléotidique correcte, à savoir "C-C-C-G-A-C", codent pour une séquence "Pro-Asp" en positions 113-114 de la séquence peptidique, et non pour une séquence "Arg-Pro" comme cela était le cas avec la séquence erronée comportant les nucléotides "C-G-A-C-C-C" aux positions 337 à 342.

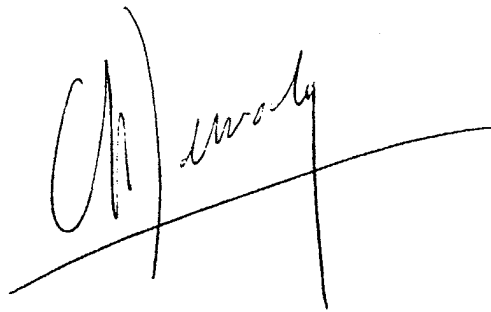
Par conséquent, à la lumière de ce qui a été exposé ci-dessus, nous vous remercions de bien vouloir donner une suite favorable à la présente demande de corrections des séquences nucléotidique et peptidique susmentionnées.

A cet effet, vous trouverez ci-joint en trois exemplaires les nouvelles figures 8 et 9A dans lesquelles les séquences nucléotidique et peptidique sont respectivement corrigées de la manière indiquée ci-dessus. Nous vous remercions de bien vouloir publier la présente demande avec les nouvelles figures 8 et 9A ci-jointes.

Vous trouverez également ci-joint une nouvelle liste de séquences, ainsi qu'une disquette informatique contenant cette liste de séquences, dans laquelle

les séquences nucléotidiques représentées par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4 et SEQ ID NO 6, ainsi que les séquences peptidiques représentées par SEQ ID NO 3 et SEQ ID NO 5, sont corrigées de la manière indiquée ci-dessus.

Nous vous prions d'agréer, Messieurs, l'expression de nos sentiments les meilleurs.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'CD Demachy', is written over a horizontal line that extends across the page.

Charles Demachy

P.J. (par courrier recommandé A/R): - annexes I à VII,  
- nouvelles figures 8 et 9A,  
- nouvelle liste de séquences,  
- une disquette.